

**Regulation des Methioninzyklus durch die
Polyaminbiosynthese und den Ethylensignalweg in
*Arabidopsis thaliana***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
am Botanischen Institut
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Yasmin Oppermann
aus Flensburg

Mai 2013

Erste Gutachterin: Prof. Dr. Margret Sauter

Zweite Gutachterin: PD Dr. Bianka Steffens

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2013

Zum Druck genehmigt: 24.07.2013

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
ZUSAMMENFASSUNG	4
SUMMARY	6
EINLEITUNG.....	8
Schwefelmetabolismus in Pflanzen	8
Polyaminbiosynthese	14
Ethylenbiosynthese und Ethylensignalweg.....	17
Zielsetzung.....	21
MATERIAL UND METHODEN.....	22
Medien zur sterilen Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
Pflanzenmaterial und Anzucht der Pflanzen	23
Phänotypanalysen.....	25
Molekularbiologische Methoden	27
Isolierung genomischer DNA.....	27
Isolierung von Gesamt-RNA	27
Polymerase Kettenreaktion.....	29
Transkriptanalysen über quantitative Real Time PCR	31
Extraktion freier Polyamine aus <i>Arabidopsis</i>	33
Bestimmung der Ethylenproduktion über Gaschromatographie	34
Analyse der Schwefelmetabolite	34
Analysen der Promotor::GUS-Linien	34

MTN-Enzymanalysen	35
Isolierung von Gesamtprotein aus Arabidopsis	35
MTA-Nukleosidase Assay	36
SDS-PAGE	37
Westernblot	37
Untersuchungen zur Translationseffizienz und zum Proteinabbau	39
Datenbankrecherchen.....	39
ERGEBNISSE.....	40
Inhibition des Wurzelwachstums von <i>mtn1</i> durch MTA	40
Methionin, S-Adenosylmethionin und Methylthioadenosin akkumulieren in der Wurzel bei Wachstum auf MTA.....	42
Der Ethylensignalweg ist nicht verantwortlich für das reduzierte Wachstum der <i>mtn1-1</i> Mutanten	45
Veränderungen in der Auxinverteilung oder der Zellteilung sind nicht verantwortlich für das reduzierte Wurzelwachstum der <i>mtn1</i> Mutanten	46
Regulation des Methioninzyklus durch die Polyaminbiosynthese	49
Wachstum auf 500 µM MTA steigert den Gehalt von Putrescin, Spermidin und Spermin in den Wurzeln von Arabidopsis	50
Spermin fördert das Wurzelwachstum in den <i>mtn1</i> Mutanten signifikant.....	51
Veränderungen in der Polyaminbiosynthese führen zu keinem den <i>mtn1</i> Mutanten ähnlichen Wurzelphänotyp	55
Cyclohexylamin führt zu keiner sichtbaren Veränderung des Wachstums von Spermidinsynthesemutanten.....	60
Regulation der MTN durch die Ethylenantwort.....	61
Inhibition der MTN-Aktivität durch Ethylen	61
<i>MTN</i> -Promotorbereiche enthalten keine Motive für Ethylen-abhängige Transkriptionsfaktoren	64
Die Reduktion der MTN-Aktivität beruht nicht auf geringeren <i>MTN</i> Transkriptmengen	66
ACC Behandlung führt zu geringeren MTN1 Proteinmengen	67
Die Ethylenantwort, nicht die Ethylenproduktion, ist für die Regulation der MTN- Aktivität verantwortlich	76

DISKUSSION UND AUSBLICK.....	82
<i>mtn1</i> Mutanten haben ein reduziertes Wurzelwachstum	83
Polyamine als Regulatoren des Wurzelwachstums	86
Regulation des Methioninzyklus durch die Ethylenbiosynthese und den Ethylensignalweg	90
LITERATURVERZEICHNIS	98
ANHANG.....	120
DANKSAGUNG	122
LEBENS LAUF	123

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1-MCP	1-Methylcyclopropen
ACC	1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure
<i>acl5</i>	<i>acaulis5</i>
ACO	ACC-Oxidase
ACS	ACC-Synthase
ADC	Arginin-Decarboxylase
ADP	Adenosindiphosphat
ARD	Acireducton-Dioxygenase
ATP	Adenosintriphosphat
DAO	Diamin-Oxidase
<i>bud2-2</i>	<i>bushy and dwarf2-2</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>copy-DNA</i>)
CGS	Cystathionin-γ-Synthase
CHA	Cyclohexylamin
CHX	Cycloheximid
<i>ctr1</i>	<i>constitutive triple response1</i>
Cys	Cystein
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dSAM	Decarboxyliertes SAM
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure
EIL	Ethylene Insensitive3 Like
EIN3	Ethylene Insensitive3
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERF	Ethylene Response Factor
et al.	<i>et alli</i>
<i>eto3</i>	<i>ethylene-overproducer3</i>

GC	Gaschromatographie
GSH	Glutathion
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
INT	2-(4-Iodophenyl)-3-(4-Nitrophenyl)-5-Phenyltetrazolium Chlorid
kDA	Kilodalton
KMTB	2-Keto-4-Methylthiobutyrat
Met	Methionin
MG132	N-(benzyloxycarbonyl)leucinylleucinylleucinal
mRNA	Boten RNA (<i>messenger RNA</i>)
MS	Nährmedium nach Murashige und Skoog
MTA	5'-Methylthioadenosin
MTAN	MTA/SAH-Nukleosidase
MTK	Methylthioribose-Kinase
MTN	MTA-Nukleosidase
MTR	Methylthioribose
MTR-P	Methylthioribose-Phosphat
NA	Nicotianamin
NAAT	Nicotianamin-Aminotransferase
NAS	Nicotianamin-Synthase
OAS	O-Acetylserin
PAO	Polyamin-Oxidase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PLP	Pyridoxalphosphat
PUT	Putrescin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Real Time PCR
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin

SAMDC	SAM-Decarboxylase
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodiumdodecylsulfate</i>)
SMM	S-Methylmethionin
SPD	Spermidin
SPDS	Spermidin-Synthase
SPM	Spermin
SPMS	Spermin-Synthase
STS	Silberthiosulfat
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TSPM	Thermospermin
TSPMS	Thermospermin-Synthase
Tris	Tri(hydroxymethyl)-Aminomethan
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen (<i>weight per volume</i>)
WT	Wildtyp

ZUSAMMENFASSUNG

Im Methioninzyklus wird Methylthioadenosin (MTA), das Nebenprodukt der Polyamin-, Ethylen- und Nicotianaminbiosynthese, zu Methionin recycelt. In dieser Arbeit wurden zum Einen mögliche Regulationen des Methioninzyklus durch die Polyaminbiosynthese in *Arabidopsis thaliana* untersucht. *Arabidopsis* besitzt zwei Gene für die MTA-Nukleosidase (MTN; At4g38800, At4g34840), welche den Eingangsschritt des Methioninzyklus katalysiert. T-DNA-Insertionsmutanten von *MTN1* zeigten bei Anzucht auf MTA als Schwefelquelle ein stark reduziertes Wachstum. *mtn1-1/mtn2-1* Doppelmutanten besaßen eine verlängerte vegetative Wachstumsphase und waren steril. Es wurde bereits gezeigt, dass Spermidin in der Lage ist das reduzierte Keimlingswachstum und die Infertilität der Doppelmutante zu komplementieren. In dieser Arbeit konnte das reduzierte Wurzelwachstum der *mtn1* Mutanten durch Spermin komplementiert werden, obwohl die internen Spermingehalte in den Wurzeln auf MTA als Schwefelquelle erhöht waren. Es ist möglich, dass die Inhibierung von Enzymen durch MTA bei dem reduzierten Wurzelwachstum der *mtn1* Mutanten eine Rolle spielt. MTA ist in der Lage Enzyme wie die Spermidin-Synthase *in vitro* zu inhibieren. Um den Zusammenhang von Wurzelwachstum und Polyaminen weiter zu untersuchen, wurden Loss-of-function-Mutanten verwendet. Mutanten der Spermidin-Synthase (At1g23820, At1g70310), Spermin-Synthase (At5g53120), Thermospermin-Synthase (At5g19530) und zwei Acyl-Transferasen (At2g23510, At2g25150) zeigten keinen, den *mtn1* Mutanten ähnlichen Phänotyp. Die Inhibierung dieser Enzyme der Polyaminbiosynthese scheint nicht für das reduzierte Wachstum der *mtn1* Mutanten verantwortlich zu sein. Über welche Mechanismen Spermin das Wurzelwachstum verändert ist noch nicht verstanden. In dieser Arbeit wurden außerdem die Regulation des Methioninzyklus durch die Ethylenbiosynthese und den Ethylensignalweg untersucht. Es wurde gezeigt, dass Ethylen zu einer Reduktion der MTN-Aktivität über die Reduktion der MTN1 Proteinmenge führt. Die Reduktion von MTN1 scheint weder transkriptionell noch über den Proteinabbau reguliert zu sein. Analysen der Ethylenmutanten *ethylene insensitive2* (*ein2*), *ethylene overproducer3* (*eto3*) und *constitutive triple*

response1 (ctr1) zeigten, dass die Reduktion der MTN1 Proteinmenge nicht über die Ethylenproduktion, sondern über den Ethylensignalweg reguliert wird. Es wäre denkbar, dass der Ethylensignalweg ein Protein reguliert, welches direkt mit MTN1 interagiert um die Proteinmenge zu reduzieren. Protein Interaktion mit MTN1 wurde bereits für CALCINEURIN B-LIKE3 (CBL3) gezeigt. Diese Interaktion ist Kalzium-abhängig und führt zu einer Reduktion der MTN1-Aktivität. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Reduktion der MTN-Aktivität durch Ethylen über Kalzium-abhängige Interaktion CBL3 reguliert wird. Kalzium führte zu einer Reduktion der MTN-Aktivität, unabhängig von Ethylen. Kalzium-abhängige Interaktion mit CBL3 ist nicht der Grund für die reduzierte MTN-Aktivität in Anwesenheit von Ethylen. Der genaue Mechanismus zur Regulation von MTN1 über den Ethylensignalweg muss noch weiter analysiert werden.

SUMMARY

The Met cycle salvages the reduced sulfur group from methylthioadenosine (MTA) the by-product of polyamine, ethylene and nicotianamine synthesis. In one part of this thesis *Arabidopsis thaliana* was employed to study regulation of the Met cycle by the polyamine biosynthesis. In *Arabidopsis* two genes encode MTA nucleosidase (MTN; At4g38800, At4g34840), which catalyzes the first committed step in the Met cycle. T-DNA-Insertion mutants of *MTN1* grown on MTA as sulfur source showed severely reduced growth. *mtn1-1/mtn2-1* double mutants had a prolonged vegetative stage and were sterile. It was already shown that spermidine complements retarded growth of *mtn1* seedlings and infertility of *mtn1-2/mtn2-1* double mutants. In this thesis reduced root growth of *mtn1* plants was complemented by spermine, although internal spermine levels were elevated in roots grown on MTA as sulfur source. It is possible that enzyme inhibition by MTA plays a role in reduced root growth of *mtn1*. MTA is able to inhibit enzymes like spermidine synthase *in vitro*. To further study root growth in relation to polyamines, loss-of-function mutants were employed. Mutants of spermidine synthase (At1g23820, At1g70310), spermine synthase (At5g53120), thermospermine synthase (At5g19530) and two acyl transferases (At2g23510, At2g25150) did not have a phenotype comparable to *mtn1* grown on MTA. Disrupting activity of these enzymes does not seem to be responsible for reduced *mtn1* growth. It is not yet understood how spermine affects root growth of *mtn1* mutants. Furthermore this study was employed to analyze regulation of the Met cycle by the ethylene biosynthesis and the ethylene signaling pathway. In this thesis it was shown that ethylene leads to a reduction of MTN activity by reducing the abundance of MTN1 protein. Neither changes in *MTN* transcripts nor changes in protein degradation were responsible for reduced MTN1 protein abundance. Studying the ethylene mutants *ethylene insensitive2* (*ein2*), *ethylene overproducer3* (*eto3*) and *constitutive triple response1* (*ctr1*) pointed to the ethylene signaling rather than ethylene synthesis as a cause for MTN1 reduction. It is possible that ethylene signaling regulates a protein which interacts with MTN1 to reduce protein abundance.

Protein interaction with MTN1 was shown for CALCINEURIN B-LIKE3 (CBL3). It is a calcium-dependent interaction and leads to reduced MTN1 activity. The probability of calcium-dependent interaction with CBL3 as the cause of ethylene-induced reduction of MTN activity was analyzed. Calcium led to a reduction of MTN activity independent of the presence of ethylene. Calcium-dependent interaction with CBL3 is hence not the cause for reduced MTN-activity in the presence of ethylene. Further studies will have to be done to reveal the mechanism of regulation.

EINLEITUNG

Schwefelmetabolismus in Pflanzen

Die schwefelhaltige Aminosäure Methionin ist in allen Organismen essentiell für die Proteinsynthese. In Pflanzen ist Methionin Teil der Methylierungsreaktionen und der Synthese von Polyaminen, Ethylen und Nicotianamin. Pflanzen nehmen Schwefel in Form von Sulfat über die Wurzeln auf. Sulfat wird durch Sulfat-Permeasen über die Plasmamembran transportiert (Smith et al., 1995). Die Assimilation des Sulfates durch Synthese von Cystein findet sowohl im Zytosol als auch in Mitochondrien und Plastiden statt (Wirtz und Hell, 2007).

Sulfattransporter werden aufgrund ihrer Proteinsequenz, ihrer kinetischen Eigenschaften und ihrer Lokalisation in vier Gruppen eingeteilt (Grossman und Takahashi, 2001). Die Mitglieder der ersten Gruppe weisen eine sehr hohe Affinität zu Sulfat auf und werden hauptsächlich in den Wurzeln von Pflanzen exprimiert, die unter Sulfatmangel leiden. Sulfattransporter der Gruppe zwei haben eine niedrigere Affinität zu Sulfat und sind im Leitgewebe exprimiert. Diese Gruppe spielt eine Rolle für die interne Verteilung von Sulfat. Die Gruppe drei besteht aus Proteinen, die untereinander eine signifikante Ähnlichkeit in ihrer Sequenz besitzen und vor allem in den Blättern exprimiert werden. Die Rolle dieser Proteine im Sulfattransport ist noch weitgehend unbekannt. Die vierte Gruppe der Sulfattransporter beinhaltet Proteine die spezifisch in den Plastiden lokalisiert sind. Die Gene dieser Transporter weisen Ähnlichkeiten zu Sulfattransportern aus Algen auf (Flügge et al., 1989; Takahashi et al., 1999).

Sulfat wird mit der Hilfe von ATP durch ATP-Sulfurylase zu Adenosinphosphosulfat (APS) aktiviert. Die meisten Pflanzen setzen APS über APS-Reduktase direkt zu Sulfit um. In vielen Pilzen und einigen Cyanobakterien ist 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS) ein Zwischenprodukt. Für den Zwischenschritt über PAPS werden sowohl eine APS-Kinase als auch eine PAPS-Reduktase benötigt. Im nächsten Schritt wird Sulfit zu Sulfid reduziert. Diese Reaktion wird durch Sulfit-Reduktase katalysiert. Zusammen mit

O-Acetylserin, welches von Serin-Acetyltransferase (SAT) aus Serin und Acetyl-CoA gebildet wird, werden aus Sufid die schwefelhaltige Aminosäure Cystein und Acetat. Die Übertragung des reduzierten Schwefels auf O-Acetylserin wird von O-Acetylserin-(thio)-Lyase katalysiert (Leustek et al., 2000b; Hawkesford und Wray, 2000; Saito, 2004; Kopriva, 2006).

Um Methionin *de novo* zu synthetisieren, wird neben dem Schwefellieferanten Cystein O-Phosphohomoserin als Lieferant des Kohlenstoffgerüsts benötigt. Über mehrere enzymatische Schritte wird O-Phosphohomoserin aus Asparaginsäure synthetisiert (Abb. 1). Neben der Synthese von Methionin ist O-Phosphohomoserin das Substrat der Threonin-Synthase. Dieses Enzym ist ein Ansatzpunkt für die Regulation der internen Methioninspiegel in Pflanzen. In Arabidopsis wird die Aktivität der Threonin-Synthase durch S-Adenosylmethionin (SAM) induziert, wodurch der interne Methioningehalt verringert wird (Curien et al., 1996, 1998).

Die Bildung von Homocystein, der direkten Vorstufe von Methionin, verläuft in Pflanzen über Cystationin- γ -Synthase (CGS) und Cystationin- β -Lyase (CBL) (Hesse und Höfgen, 2003; Hesse et al., 2004). In Arabidopsis ist CGS ein weiterer Ansatzpunkt zur Regulation der Methioninsynthese. SAM ist in der Lage, die Degradation von CGS mRNA zu fördern, wahrscheinlich über ein durch SAM aktiviertes Enzym (Chiba et al., 2003; Kreft et al., 2003; Onouchi et al., 2004). In Hefe und Cyanobakterien wird Cystein direkt zu Homocystein metabolisiert. Die Katalyse dieser Reaktion übernimmt Homocystein-Synthase (Gophna et al., 2005). Ein entsprechendes Ortholog ist aus Pflanzen bislang nicht bekannt. Die pflanzliche CGS besitzt allerdings eine geringe Homocystein-Synthase-Aktivität (Hesse et al., 2004). Die Methylierung der Schwefelgruppe durch Methionin-Synthase führt in bakteriellen und pflanzlichen Organismen zur Bildung der für tierische Organismen essentiellen Aminosäure Methionin. Methionin-Synthase ist nicht ausschließlich für die *de novo* Synthese von Methionin verantwortlich. Das Enzym spielt zusätzlich eine Rolle beim Recycling der Methylgruppe von SAM nach Verwendung als Substrat für Methylierungsreaktionen. Somit ist Methionin-Synthase auch in Organismen essentiell, die Methionin nicht *de novo* synthetisieren können (Ravanel et al., 1998; Eckermann et al., 2000; Droux, 2004; Hesse et al., 2004). Etwa 20% des

vorhandenen Methionins werden für die Proteinbiosynthese verwendet, 80% werden unter Verwendung von ATP zu SAM aktiviert (Giovanelli et al., 1985). SAM ist Ausgangssubstrat für die Methylierung von DNA, Phospholipiden und die Synthese von Cyclopropan-Fettsäuren (Chiang et al., 1996; Fontecave et al., 2004). Zusätzlich ist SAM das Ausgangssubstrat der Ethylen-, Polyamin- und Nicotianaminbiosynthese (Herbik et al., 1999; Miyazaki und Yang, 1987; Pegg et al., 1981; Wu et al., 2008). Die Menge an vorhandenem freiem Methionin hängt neben der *de novo* Synthese von drei Recyclingwegen ab. Bei der Verwendung von SAM als Substrat für Methylierungsreaktionen entsteht als Nebenprodukt S-Adenosylhomocystein (SAH), welches durch die SAH-Hydrolase zu Homocystein und weiter zu Methionin umgesetzt wird (Kloor und Osswald, 2004). Eine Akkumulation von SAH führt zur Inhibierung der Methylierungsreaktionen (Kloor et al., 1998; Kloor und Osswald, 2004). Die zweite Möglichkeit zur Regeneration von Methionin führt über S-Methylmethionin (SMM) (Abb. 1). In Pflanzen, wie zum Beispiel Poaceen, Fabaceen und Brassicaceen, ist SMM die am häufigsten vorkommende Form von reduziertem Schwefel im Phloem. Die Synthese von SMM kann zusätzlich zur kurzzeitigen Regulation der SAM-Spiegel dienen (Bourgis et al., 1999; Ranocha et al., 2001; Kocsis et al., 2003).

Die dritte Möglichkeit zur Regeneration von Methionin ist der sogenannte Methioninzyklus oder Yang-Zyklus, der in Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren zu finden ist (Baur und Yang, 1969; 1972; Wang et al., 1982). Im Methioninzyklus wird das bei der Synthese von Ethylen, Nicotianamin und der Polyamine Spermidin, Spermin und Thermospermin produzierte Methylthioadenosin (MTA) recycelt. MTA enthält die reduzierte Schwefelgruppe und wird im Eingangsschritt des Methioninzyklus unter Abspaltung von Adenin zu Methylthioribose (MTR) umgesetzt. Diese Reaktion wird in Pflanzen und Bakterien von der MTA-Nukleosidase (MTN) katalysiert (Albers et al., 2009). In tierischen Organismen wird MTA ohne die Produktion von MTR durch MTA-Phosphorylase direkt zu MTR-P umgesetzt (Schlenk, 1983).

In Arabidopsis wird MTN von zwei Genen kodiert (*MTN1*, *At4g38800*; *MTN2*, *At4g34840*). In allen bisher untersuchten Geweben und Entwicklungsstadien war MTN1 für bis zu 80% der Gesamtzymaktivität

verantwortlich, während MTN2 mit bis zu 20% an der Gesamtzymaktivität beteiligt war (Bürstenbinder et al., 2010; Waduware-Jayabahu et al., 2012). Bei Schwefelvollversorgung zeigten Mutanten mit einer T-DNA-Insertion in *MTN1* (*mtn1-1*; *mtn1-2*) oder *MTN2* (*mtn2-1*; *mtn2-2*) keine phänotypischen Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp. Wurde MTA als Schwefelquelle angeboten, so zeigten *mtn1* Mutanten ein reduziertes Wachstum (Bürstenbinder et al., 2010). *mtn1-2/mtn2-1* Doppelmutanten zeigten bei Anzucht auf Erde eine verlängerte Phase des vegetativen Wachstums, eine erhöhte Anzahl an gebildeten Blütenstielen und eine verringerte Fertilität. Analysen bei denen humane MTA-Phosphorylase (MTAP) in *mtn1-1/mtn2-1* Doppelmutanten exprimiert wurde zeigten, dass Akkumulation von MTA und nicht das Fehlen von MTR für den Phänotyp der *mtn1-1/mtn2-1* Doppelmutanten verantwortlich ist (Waduware-Jayabahu et al., 2012). In Pflanzen und Bakterien wird der Schritt von MTR zu Methylthioribose-1-Phosphat (MTR-P) von der MTR-Kinase (MTK) katalysiert (Abb. 1). MTK wird in Arabidopsis von einem Einzelkopiegen kodiert (*At1g49820*). Unter Schwefelvollversorgung hat das Ausschalten des Methioninzyklus durch T-DNA-Insertion in *MTK* (*mtk*) für die Pflanzen keine morphologischen Auswirkungen (Sauter et al., 2004). Bei Wachstum der *mtk* Mutanten auf MTA zeigten diese Pflanzen einen vom Wildtyp und der *mtn1* Mutante abweichenden Phänotyp. Die *mtk* Mutanten enthalten im Vergleich zum Wildtyp und den *mtn1* Mutanten weniger SAM und MTA (Bürstenbinder et al., 2007).

Eine Punktmutation in dem Gen der ACC-Synthase9 (ACS9) führt zu der Ethylen-überproduzierenden Mutante *ethylene overproducer3* (*eto3*). Die Keimlinge dieser Mutante haben bei etiolierter Anzucht eine dauerhaft ausgeprägte Dreifachantwort. Analysen von *mtk/eto3* Doppelmutanten zeigten, dass Methioninrecycling für eine anhaltend hohe Ethylenproduktion der *eto3* Keimlinge ebenso notwendig ist wie für die dauerhafte Ausprägung der Dreifachantwort, da etiolierte Keimlinge der *mtk/eto3* Doppelmutanten einen intermediären Phänotyp im Vergleich zu *mtk* Mutanten und *eto3* Mutanten zeigten (Bürstenbinder et al., 2007).

Für die Umsetzung von MTR-P zu Acireduktion, dem nächsten Zwischenprodukt des Methioninzyklus, sind die Aktivitäten einer Isomerase,

einer Dehydratase, einer Enolase und einer Phosphatase notwendig (Albers, 2009). Die Gene für diese Enzyme wurden in Arabidopsis identifiziert (Pommerrenig et al., 2011). Methylthioribose-1-Phosphat-Isomerase (*MTI*, *At2g05830*) und Methylthioribulose-1-Phosphat-Dehydratase/Enolase/Phosphatase (*DEP*, *At5g53850*) sind in Arabidopsis von Einzelkopiegenen kodiert. MTR-P wird von MTI und DEP zu Acireduktion zu metabolisiert. Die Eisen gebundene Form der Acireduktion-Dioxygenase (ARD) katalysiert die zum Methioninzyklus gehörende Umsetzung von Acireduktion zu 2-Keto-4-Methylthiobuttersäure (KMTB). ARD kann sowohl mit Eisen als auch mit Nickel als Kofaktor agieren. Die Verwendung von Nickel als Kofaktor führt zur Synthese von 3-Methylthiopropionsäure. In Arabidopsis wird ARD von vier Genen (*At4g14716*; *At4g14710*; *At2g26400*; *At5g43850*) kodiert (Sauter et al., 2005).

Durch eine Transaminase wird KMTB im letzten Schritt des Methioninzyklus zu Methionin recycelt. Für diesen letzten Schritt sind in Arabidopsis noch keine Gene bekannt, die für Enzyme kodieren, welche spezifisch im Methioninzyklus aktiv sind (Kushad et al., 1983; Pommerrenig et al., 2011). In Arabidopsis ist die Regulation der einzelnen Schritte des Methioninzyklus noch weitestgehend unbekannt.

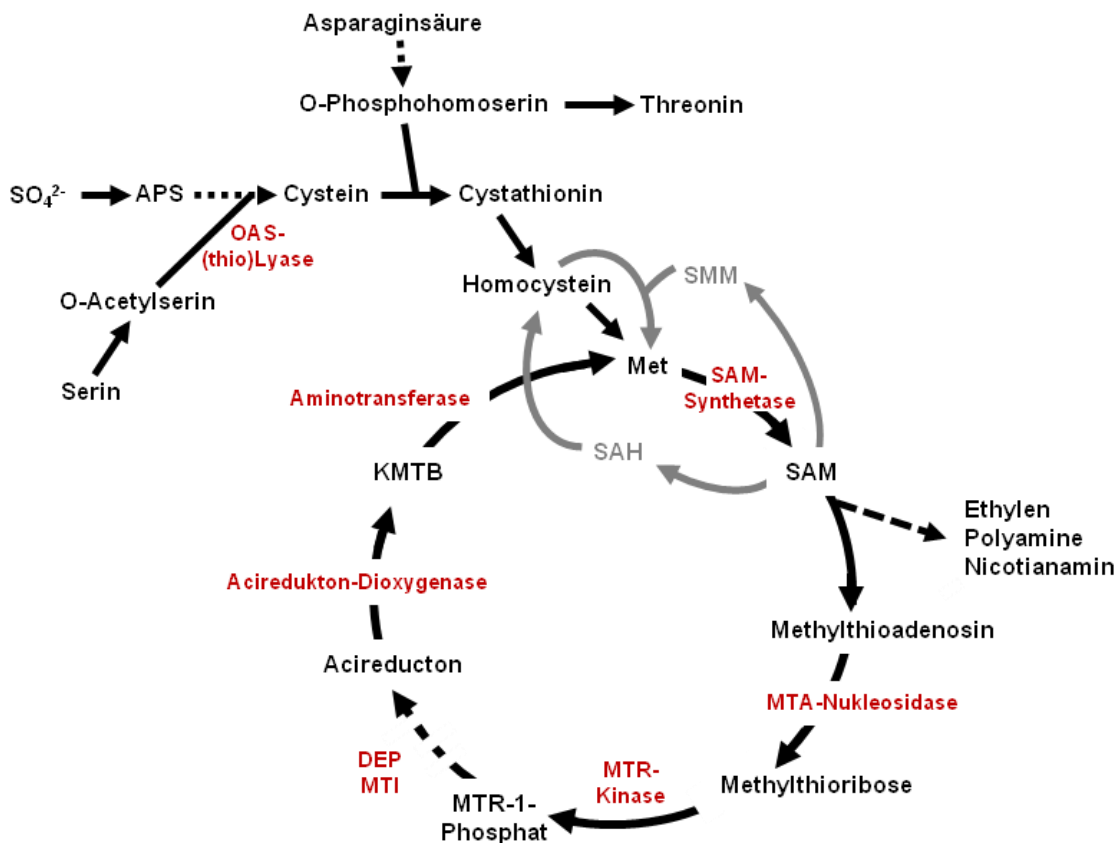


Abbildung 1: Synthese und Recycling von Methionin *Arabidopsis thaliana*.

Der anorganische zu Sulfid reduzierte Schwefel wird von der O-Acetylserin(thio)lyase auf O-Acetylserin (OAS) übertragen wodurch die schwefelhaltige Aminosäure Cystein synthetisiert wird. Die Methioninbiosynthese beginnt mit der Synthese von Cystathionin aus Cystein und dem aus Asparaginsäure synthetisiertem O-Phosphohomoserin (OPHS). OPHS ist auch Ausgangssubstrat der Threoninsynthese. Über Homocystein erfolgt die Synthese von Methionin (Met). Met wird von der S-Adenosylmethionin-Synthetase zu S-Adenosylmethionin (SAM) umgesetzt. SAM dient als Methylgruppendonor und als Ausgangssubstrat für die Polyamin-, Ethylen-, und Nicotianaminbiosynthese. Über S-Methylmethionin (SMM), S-Adenosylhomocystein (SAH) und über den Methioninzyklus kann Methionin recycelt werden. Der Eingangsschritt des Methioninzyklus wird von der Methylthioadenosin-Nukleosidase (MTN) katalysiert, wobei unter Abspaltung von Adenin Methylthioribose (MTR) entsteht. MTR wird von der MTR-Kinase zu MTR-1-Phosphat phosphoryliert. Die Metabolisierung zu Acireducton wird von der Methylthioribose-1-Phosphat-Isomerase (MTI) und der Methylthioribulose-1-Phosphat Dehydratase/Enolase/Phosphatase (DEP) katalysiert. Die Acireduktion-Dioxygenase setzt Acireducton zu 2-Keto-4-Methylthiobuttersäure (KMTB) um, welche im letzten Schritt des Methioninzyklus von einer Aminotransferase zu Methionin recycelt wird. Polyamin-, Ethylen-, und Nicotianaminbiosynthese teilen sich SAM als Ausgangssubstrat und produzieren als Nebenprodukt Methylthioadenosin.

Polyaminbiosynthese

Polyamine sind kleine, kationische Moleküle mit zwei oder mehr Aminogruppen. Die in allen Organismen am weitesten verbreiteten Polyamine sind Putrescin, Spermidin und Spermin. Diese Polyamine beeinflussen Transkription, Proteinsynthese, Modulation von Enzymaktivitäten und Zellteilung. In Pflanzen sind Polyamine in die Wurzelbildung, Blütenbildung und Verzögerung der Seneszenz involviert (Bagni, 1966; Boucherou et al., 1999; Evans und Malmberg, 1989; Galston und Sawhney, 1990; Igarashi und Kashiwagi, 2000; Kumar et al., 1997; Tabor und Tabor, 1999; Walden et al., 1997).

Die Synthese von Putrescin kann ausgehend von Ornithin, sowohl direkt über Ornithin-Decarboxylase (ODC), als auch ausgehend von Arginin über Arginin-Decarboxylase (ADC), Agmatin-Iminohydrolase (AIH) und N-Carbamoylputrescin-Amidohydrolase (CPA) stattfinden (Janowitz et al., 2003; Piotrowski et al., 2003; Tabor und Tabor, 1985). In Pflanzen scheint der Syntheseweg über Arginin an der Regulation diverser Stressantworten, wie zum Beispiel Salztoleranz, Trockenstress und Hypoxia, beteiligt zu sein (Alcàzar et al., 2010; Liu et al., 2007). Arabidopsis besitzt kein Gen, welches für ODC kodiert. Die Synthese von Putrescin findet hier ausschließlich über Arginin statt (Hanfrey et al., 2001).

Die Synthese von Spermidin, Spermin und dem Sperminisomer Thermospermin übernehmen Spermidin-Synthase (SPDS), Spermin-Synthase (SPMS) und Thermospermin-Synthase (TSPMS) (Abb. 2). Dazu wird der Aminopropylrest von decarboxyliertem S-Adenosylmethionin (dSAM) auf Putrescin oder Spermidin übertragen (Hanzawa et al., 2000, 2002; Imai et al., 2004; Kakehi et al., 2008; Panicot et al., 2002; Tirbucio et al., 1990). dSAM entsteht durch Abspaltung der Carboxylgruppe von SAM durch die S-Adenosylmethionin-Decarboxylase (SAMDC), welche den limitierenden Schritt der Polyaminbiosynthese katalysiert (Imai et al., 2004; Kusano et al., 2008). Das komplette Ausschalten von ADC oder SPDS, welche in Arabidopsis von jeweils zwei Genen kodiert werden, führt zur Embryoletalität (Imai et al., 2004; Urano et al., 2005). Ebenfalls embryonal ist das Ausschalten von zwei der vier für SAMDC kodierenden Gene in der *samdc1-1/bud2-2* Doppelmutante

(Ge et al., 2006). Die Synthese von Polyaminen ist somit essentiell für das Wachstum und die Entwicklung.

Der Abbau des Diamins Putrescin und der Polyamine Spermidin und Spermin wird jeweils durch Kupfer-abhängige Diamin-Oxidasen (DAOs) und FAD-abhängige Polyamin-Oxidasen (PAOs) katalysiert (Bagni und Tassoni, 2001) (Abb. 2). In *Arabidopsis* wird die Familie der DAOs von zwölf Genen kodiert. Diese scheinen sowohl durch biotische als auch abiotische Signale reguliert zu sein (Wimalasekera et al., 2011; Zimmermann et al., 2004). Die Familie der PAOs wird in *Arabidopsis* von fünf Genen kodiert. Das Enzym ist im Apoplasten, im Zytoplasma und in den Peroxisomen lokalisiert (Moschou et al., 2008; Sebela et al., 2001; Tavladoraki et al., 2006; Vera-Sirera et al., 2010). Zwei der identifizierten PAOs in *Arabidopsis* (PAO1, PAO3) weisen Homologien zu PAOs aus tierischen Organismen auf. Diese pflanzlichen PAOs sind ebenso wie ihre tierischen Orthologe in der Lage, die Rückreaktion von Spermin zu Spermidin und von Spermidin zu Putrescin zu katalysieren (Moschou et al., 2008; Tavladoraki et al., 2006). Polyamine können neben der freien Form (Abb. 2) auch als konjugierte Polyamine in Pflanzen vorkommen. Als Konjugate dienen zum Beispiel Zimtsäuren wie p-Cumarinsäure, Folsäure und Kaffeesäure (Bagni und Tassoni, 2001; Hamasaki und Galston, 1990; Moschou et al., 2008b). In *Arabidopsis* wurden für die Konjugation von Spermidin bislang die Enzyme Spermidin-Disinapoylacyltransferase (SDT) und Spermidin-Dicoumaroylacyltransferase (SCT) identifiziert (Luo et al., 2009). Der Polyaminmetabolismus besteht aus einer Vielzahl von Schritten und Regulationspunkten. Polyamine sind an vielen, sehr unterschiedlichen Wachstumsreaktionen und Entwicklungsprozessen beteiligt (Bagni, 1966; Boucherou et al., 1999; Evans und Malmberg, 1989; Galston und Sawhney, 1990; Igarashi und Kashiwagi, 2000; Kumar et al., 1997; Tabor und Tabor, 1999; Walden et al., 1997). Wie genau Polyamine dabei als Signal oder Reaktionsauslöser fungieren ist noch weitgehend unverstanden.

Die Polyaminbiosynthese beginnt mit der Umsetzung von S-Adenosylmethionin (SAM) zu decarboxyliertem SAM (dSAM) durch SAM-Decarboxylase (SAMDC). Aus dem Diamin Putrescin (PUT) und dem Aminopropylrestes des dSAMs wird durch Spermidin-Synthase (SPDS) das Triamin Spermidin synthetisiert. Putrescin entsteht über die Metabolisierung von Arginin (ARG) zu Agmatin und N-Carbamoylputrescin. Die an der Umsetzung beteiligten Enzyme sind Arginin-Decarboxylase (ADC) Agmatin-Iminohydrolase (AIH) und N-Carbamoylputrescin-Amidohydrolase (CPA). Die Tetraamine Spermin und Thermospermin werden durch Übertragung eines weiteren Aminopropylrestes durch Spermin-Synthase (SPMS) und Thermospermin-Synthase (TSPMS) synthetisiert. Bei jeder Polyaminsynthese entsteht Methylthioadenosin (MTA) als Nebenprodukt. Der Abbau der Polyamine wird von Diamin-Oxidasen (DAOs) und Polyamin-Oxidasen (PAOs) katalysiert. Die PAOs sind zusätzlich in der Lage Spermin zu Spermidin und Spermidin zu Putrescin zu metabolisieren. Polyamine können in konjugierter Form vorkommen, Spermidin-Disinapoylacyltransferase (SDT) und Spermidin-Dicoumaroylacyltransferase (SCT) konjugieren Spermidin an Hydroxyzimtsäuren.

Ethylenbiosynthese und Ethylensignalweg

Ethylen ist ein sehr einfach gebautes Phytohormon und ist bereits seit Anfang des letzten Jahrhunderts als solches bekannt (Crocker und Knight, 1908; Neljubov, 1901). Ethylen ist unter anderem an der Regulation der Samenkeimung, der Seneszenz, der Blütenentwicklung, der Fruchtreife, der Wurzelentwicklung und vielen Stressreaktionen beteiligt (Barry et al., 2000; Ivanchenko et al., 2008; O'Neill, 1997; Swarup et al., 2007; Wang und Kumar, 2007). Die durch Ethylen ausgelöste Dreifachantwort von dikotylen, etiolierten Keimlingen ist eine der bekanntesten Folgen von Ethylen. Der resultierende Phänotyp wurde in Arabidopsis zur Aufklärung einiger wichtiger Schritte in der Ethylenbiosynthese und dem Ethylensignalweg verwendet (Bleecker et al., 1988; Guzman und Ecker, 1990).

Die Ethylenbiosynthese wird aufgrund der Unterschiede zwischen klimakterischen und nicht klimakterischen Früchten in System I und System II unterteilt (McMurchie et al., 1972). Eine basale Ethylenproduktion, die autoinhibitorisch wirkt, charakterisiert das System I. Diese Art der Ethylenbiosynthese findet in allen vegetativen Geweben und in sich entwickelnden Früchten statt (Alexander und Grierson, 2002). System II geht mit einer autokatalytisch gesteigerten Ethylenproduktion in klimakterischen Früchten einher. Der Übergang von System I zu System II ist entwicklungsabhängig reguliert (Yokotani et al., 2009). Seit kurzem ist eine weitere Art der Regulation der Ethylenbiosynthese untersucht. Diese Regulation beginnt, wenn die klimakterischen Früchte ihre maximale Ethylenproduktion erreicht haben. In dieser Entwicklungsphase kommt es zu einer Verringerung der Ethylenbiosynthese durch Verringerung der ACO-Expression und der ACO-Aktivität (Van de Poel et al., 2012).

Ausgangssubstrat für die Ethylenbiosynthese ist SAM. Der erste für die Ethylenbiosynthese spezifische und meist limitierende Schritt wird von der im Zytosol lokalisierten 1-Amino-1-Cyclopropane- (ACC-) Synthase (ACS) in einer Pyridoxalphosphat-abhängigen Reaktion katalysiert (Acaster und Kende, 1983; Barry et al., 2000; Boller et al., 1979; Yang und Hoffmann, 1984). Bei der Umsetzung von SAM zu ACC entsteht MTA (Adams und Yang, 1997). In

Arabidopsis besteht die ACS Genfamilie aus zwölf Mitgliedern. ACS1 kodiert für eine ACS ohne Enzymaktivität, ACS3 ist ein Pseudogen, ACS10 und ACS12 kodieren für Enzyme, die zu den Aminotransferasen gezählt werden. Daraus ergeben sich acht Gene, die in Arabidopsis für aktive ACC-Synthasen kodieren (Abel et al., 1995; Liang et al., 1995; Vogel et al., 1998; Yamagami et al., 2003). In Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) sind neun Gene bekannt, die für ACS kodieren. Diese werden während System I und System II differentiell exprimiert (Barry et al., 2000; Nakatsuka et al., 1998; Yip et al., 1992).

Die Synthese von ACC aus SAM ist ein entscheidender Schritt für die Biosynthese von Ethylen und Ansatzpunkt der Regulation. ACC-Synthasen können durch Phosphorylierung stabilisiert werden, wodurch der Abbau über den Ubiquitin-Proteasomenweg verhindert wird (Joo et al., 2008; Kamiyoshihara et al., 2010; Tatsuki und Mori, 2001). In Arabidopsis wurde gezeigt, dass ACS5 und ACS9 auf diesem Weg reguliert werden (Chae et al., 2003; Woeste et al., 1999). ACC wird durch ACC-Oxidasen (ACOs) unter Verwendung von Sauerstoff zu Ethylen CO_2 und HCN metabolisiert (Barry et al., 1996; Dong et al., 1992; Hamilton et al., 1991). Die ACO Genfamilie wird in Arabidopsis von fünf Genen kodiert. Die Enzyme sind im Zytosol lokalisiert (Chung et al., 2002; Lin et al., 2009; Reinhardt et al., 1994). In Tomate sind sechs ACOs bekannt, aber nur von dreien ist die katalytische Aktivität untersucht (Bidonde et al., 1998). ACOs nutzen Fe^{2+} als Kosubstrat und benötigen Ascorbinsäure für ihre Funktionalität (Rocklin et al., 2004). ACO Transkript kann sowohl über Ethylen als auch über andere Phytohormone reguliert werden (Chae et al., 2003; Schofield und Zhang, 1999). In Tomate ist SIHB-1 ein Homeobox Protein in der Lage an den ACO1 Promotor zu binden. Ohne SIHB-1 ist die Menge an ACO1 Transkript verringert (Lin et al., 2008). ACC dient nicht nur als Vorstufe von Ethylen sondern wird auch durch die ACC-N-Malonyl-Transferase zu 1-(Malonylamino)Cyclopropan-1-Carboxylsäure (MACC) katalysiert (Hoffmann et al., 1982; Liu et al., 1983). MACC könnte als Speicherform des ACCs fungieren (Jiao et al., 1986).

Die Ethylenperzeption erfolgt über die Ethylenrezeptoren. In Arabidopsis besteht die Familie der Ethylenrezeptoren aus fünf Vertretern, die sich aufgrund ihrer C-terminalen Regionen in 2 Unterfamilien teilen lassen. Unterfamilie I

besteht aus ETHYLENE RESPONSE1 (ETR1) und ETHYLENE RESPONSE SENSOR1 (ERS1), sie besitzen eine Histidinkinase-Aktivität. Die Rezeptoren der Unterfamilie II ETHYLENE RESPONSE2 (ETR2), ETHYLENE RESPONSE SENSOR2 (ERS2) und ETHYLENE-INSENSITIVE4 (EIN4) besitzen keine Histidinkinase-Aktivität. Die Rezeptoren bilden Dimere und weisen Sequenzähnlichkeiten zu bakteriellen Zwei-Komponenten-Histidinkinasen auf (Bleecker, 1999; Schaller und Kieber, 2002). Ethylen kann mit Kupfer als Kofaktor an den Rezeptor gebunden werden, wodurch dieser inaktiviert wird (O'Malley et al., 2005; Schaller und Bleecker, 1995).

Aktive Rezeptoren sind in der Lage, die Raf-ähnliche Serin/Threonin-Kinase CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1 (CTR1) zu aktivieren. CTR1 wirkt als negativer Regulator des Ethylensignalwegs und interagiert mit den Ethylenrezeptoren (Clark et al., 1998; Kieber et al., 1993). Ist der negative Regulator CTR1 durch die Bindung von Ethylen an den Ethylenrezeptoren inaktiv führt dies zur Aktivierung des positiven Regulators ETHYLEN-INSENSITIVE2 (EIN2) (Alonso et al., 1999). EIN2 ist ebenso wie die Ethylenrezeptoren an der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert und wird wie ACS5 und ACS9 über den Abbau durch das 26S Proteasom reguliert (Qiao et al., 2009). Das Ethylensignal wird von EIN2 an Transkriptionsfaktoren wie ETHYLEN-INSENSITIVE3 (EIN3) und ETHYLEN-INSENSITIVE3-LIKE1 (EIL1) übertragen (Alonso et al., 2003; Chao et al., 1997; Solano et al., 1998). EIN3 wird über den Abbau durch das 26S Proteasom reguliert, dabei wird die Stabilität von EIN3 durch Behandlung mit Ethylen erhöht (Gagne et al., 2004; Guo und Ecker, 2003; Potuschak et al., 2003; Yanagisawa et al., 2003). Transkriptionsfaktoren wie EIN3 und EIL1 können wiederum das Ethylensignal an andere Transkriptionsfaktoren wie die ETHYLENE RESPONSE FACTORS (ERFs) oder die ETHYLEN-RESPONSIVE DNA-BINDING FACTORS (EDFs), die sich unter anderem im Zellkern befinden, übertragen (Solano et al., 1998). Die vielfältigen Möglichkeiten zur Übertragung und Weiterleitung des Ethylensignals sprechen für die verschiedensten Reaktionen, welche durch Ethylen reguliert, aktiviert oder inhibiert werden können (Barry et al., 2000; Ivanchenko et al., 2008; O'Neill, 1997; Swarup et al., 2007; Wang und Kumar, 2007).

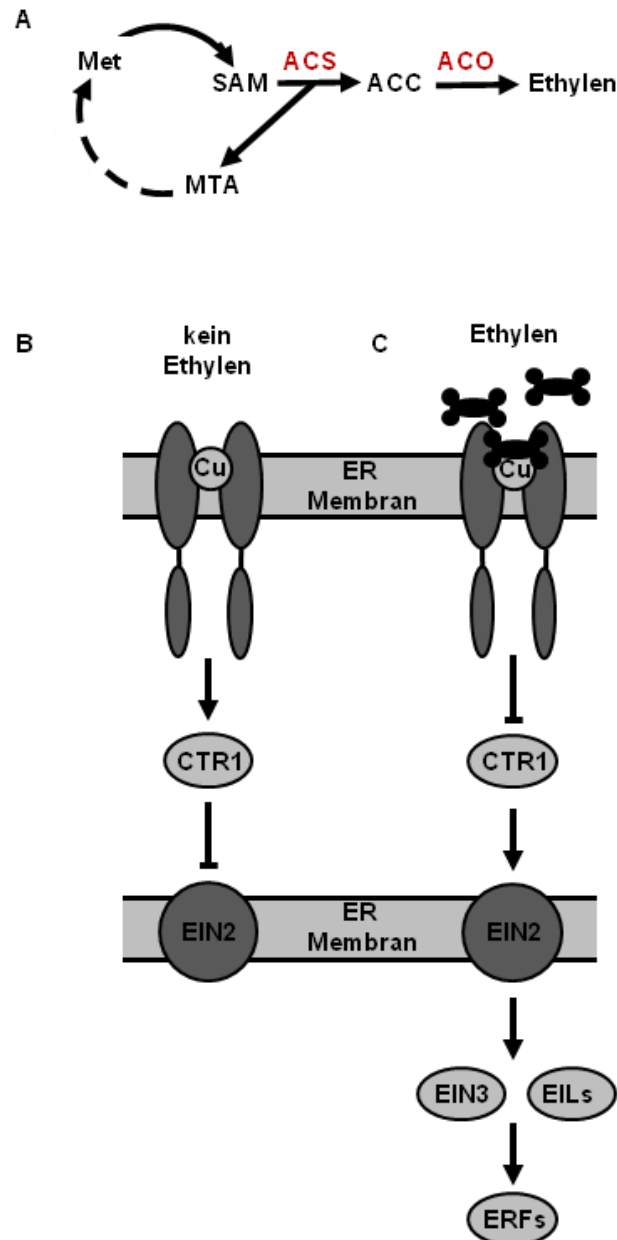


Abbildung 3: Ethylenbiosynthese und Ethylensignalweg in *Arabidopsis thaliana*.

(A) Ausgangssubstrat für die Biosynthese von Ethylen ist S-Adenosylmethionin (SAM). SAM wird von 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure-Synthase (ACS) unter Entstehung von Methylthioadenosin (MTA) zu 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC) umgesetzt. MTA wird im Methioninzyklus zu Methionin recycelt, ACC wird von ACC-Oxidase (ACO) zu Ethylen metabolisiert. (B) Ohne Ethylen sind die in der ER-Membran sitzenden Kupfer(Cu)-bindenden Ethylenrezeptoren aktiv und aktivieren das Protein CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1 (CTR1). CTR1 ist ein negativer Regulator und inhibiert die weitere Ethylenantwort. (C) Bei Anwesenheit von Ethylen werden die Rezeptoren inaktiviert. CTR1 ist inaktiv, das Ethylensignal wird an ETHYLENE-INSENSITIVE2 (EIN2) weitergeleitet. EIN2 überträgt das Signal auf Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel ETHYLENE-INSENSITIVE3 (EIN3). Diese können das Signal dann an Transkriptionsfaktoren wie die ETHYLENE-RESPONSE FACTORS (ERFs) übertragen.

Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Zusammenhänge von Methioninzyklus, Polyaminbiosynthese, Ethylenbiosynthese und Ethylensignalweg untersucht werden. Ein Punkt war die Untersuchung der *mtn1* Mutanten, welche im Eingangsschritt des Methioninzyklus, der Metabolisierung von MTA zu MTR gestört sind. Das veränderte Wachstum der Wurzeln von *mtn1* Mutanten auf MTA als Schwefelquelle sollte analysiert werden. Eine Aufgabe war es, Regulationen des Methioninzyklus durch die Polyaminbiosynthese zu untersuchen. Dazu wurden zum Einen Arabidopsismutanten des Methioninzyklus mit verschiedenen Polyaminen behandelt, zum Anderen wurde die Aktivität des Methioninzyklus in Polyaminbiosynthesemutanten analysiert. Ein weiteres Ziel war es, die Regulation des Methioninzyklus durch die Ethylenbiosynthese und den Ethylensignalweg zu untersuchen. Dazu wurde der Einfluss einer erhöhten Ethylenproduktion auf die MTA-Nukleosidase betrachtet. Zusätzlich wurde die Aktivität der MTA-Nukleosidase in den Ethylenmutanten *ethylene insensitive2* (*ein2*), *ethylene overproducer3* (*eto3*) und *constitutive triple response1* (*ctr1*) analysiert.

MATERIAL UND METHODEN

Medien zur sterilen Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Als Vollmedium zur sterilen Anzucht wurde 0,5 x MS-Medium mit Makro- und Mikrosalzen nach Murashige und Skoog (1962) verwendet. Für die Versuche zum Einfluss von MTA, wurde schwefelreduziertes Medium aus Makrosalzen, Mikrosalzen, Aminosäuren, Vitaminen und Eisen/Natrium-EDTA nach Sauter et al. (2004) zusammengestellt. Dabei setzte sich das schwefelreduzierte Medium wie folgt zusammen:

Die 10fach konzentrierte Stammlösung der verwendeten Makrosalze bestand aus 206 mM Ammoniumnitrat, 188 mM Kaliumnitrat, 12,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 30 mM Kalziumchlorid-Dihydrat und 15 mM Magnesiumchlorid-Hexahydrat. Die Makrosalze wurden nach dem Autoklavieren bei Raumtemperatur gelagert.

Die verwendete Stammlösung der Mikrosalze war 1000fach konzentriert und bestand aus 100 mM Borsäure, 66 mM Manganchlorid-Tetrahydrat, 20 mM Zinkchlorid, 1 mM Natriummolybdat-Dihydrat, 100 µM Kupferchlorid-Dihydrat, 105 µM Kobaltchlorid-Hexahydrat und 4,8 mM Kaliumjodid. Die Lösung wurde nach Sterilfiltration bei 4°C gelagert.

Die 1000fach konzentrierte Stammlösung der verwendeten Vitamine setzte sich zusammen aus 0,0125% (w/v) Nikotinsäure, 0,0125% (w/v) Pyridoxinsäure und 0,5% (w/v) Glyzin. Nach Sterilfiltration wurde die Stammlösung der Vitamine aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Die verwendete Stammlösung der Aminosäuren war 40fach konzentriert und bestand aus 3% (w/v) L-Glutamin, 0,6% (w/v) Prolin und 0,4% (w/v) Asparagin. Zur Herstellung wurde das Glutamin in etwa 90 % des Gesamtvolumens gelöst und danach Prolin und Asparagin hinzugefügt. Nach Sterilfiltration wurde die Stammlösung bei -20°C gelagert.

Zur Herstellung der 500fach konzentrierten Eisen/Natrium-EDTA-Lösung wurden 50 mM Natrium-EDTA und 50 mM Eisensulfat-Heptahydrat separat angesetzt. Die Lösungen wurden leicht erhitzt, unter Rühren gemischt und unter

Rühren abgekühlt. Die Eisen/Natrium-EDTA-Lösung wurde unter Lichtausschluss bei 4°C gelagert.

Die Stammlösungen der einzelnen Komponenten wurden in 1facher Konzentration zusammen mit 0,005% (w/v) Myoinositol, 0,38% (w/v) Gelrite und 1,5% (w/v) Saccharose für die Untersuchungen verwendet. Die einzige Schwefelquelle im schwefelreduzierten Medium stammte aus der Eisen/Natrium-EDTA-Lösung. Als Kontrollansatz wurden dem schwefelreduzierten Medium 500 µM Sulfat in Form von Magnesiumsulfat zugesetzt.

Pflanzenmaterial und Anzucht der Pflanzen

Die Untersuchungen wurden an *Arabidopsis thaliana*, Ökotyp Columbia-0 durchgeführt. Arabidopsis Wildtypsamen wurden vom GABI-KAT Max-Planck Institut (Köln, Deutschland) bezogen. Die verwendeten Mutanten wurden über die NASC (<http://arabidopsis.info>) und das Kazusa DNA Research Institute (Chiba, Japan) bezogen. In der Tabelle 1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Mutanten mit Genlokus, Bezeichnung und der Nummer der verwendeten Linien aufgeführt. Mutanten ohne eine Linienkennzeichnung stammen aus dem Kazusa DNA Research Institute.

Die Anzucht erfolgte auf einem 2:3 Sand/Humus-Gemisch. Die verwendeten Samen wurden darauf ausgebracht und für zwei Tage bei 4°C stratifiziert. Die Anzucht erfolgte bei 22°C unter Langtagbedingungen bei 16 Stunden Licht mit 70 µmol Photonen m⁻² s⁻¹ und 8 Stunden Dunkelheit.

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Mutanten

GENLOKUS	BEZEICHNUNG	MUTANTENLINIE
<i>At4g38800</i>	<i>mtn1-1</i>	SALK_085385
<i>At4g38800</i>	<i>mtn1-2</i>	GK-568C06
<i>At4g34840</i>	<i>mtn2-1</i>	SALK_071127
<i>At4g34840</i>	<i>mtn2-2</i>	GK-845B05
<i>At1g49820</i>	<i>mtk</i>	SALK_133954
<i>At1g23820</i>	<i>spds1-1</i>	
<i>At1g70310</i>	<i>spds2-1</i>	
<i>At1g70310</i>	<i>spds2-2</i>	SALK_139824
<i>At5g53120</i>	<i>spms</i>	
<i>At5g19530</i>	<i>acl5</i>	SAIL_813_C01
<i>At3g02470</i>	<i>samdc1-1</i>	SALK_020185
<i>At3g02470</i>	<i>samdc1-2</i>	SALK_020362
<i>At5g15950</i>	<i>samdc2</i>	GK-492B08
<i>At5g18930</i>	<i>samdc4/bud2-2</i>	SALK_007279
<i>At2g23510</i>	<i>sdt</i>	SM_3_38374
<i>At2g25150</i>	<i>sct</i>	SALK_120466
<i>At5g03280</i>	<i>ein2</i>	CS8843
<i>At3g49700</i>	<i>eto3</i>	N8060
<i>At5g03730</i>	<i>crt1</i>	N8057

Zur sterilen Anzucht von Arabidopsissamen wurden diese für 20 Minuten in 2%iger (v/v) Natriumhypochloritlösung oberflächensterilisiert. Im Anschluss wurden die Samen fünf Mal mit autoklaviertem Wasser gewaschen und auf Anzuchtsplatten ausgebracht. Es wurden bis zu 100 Samen pro Platte in gleichmäßigem Abstand ausgelegt und unter den bereits beschriebenen Langtagbedingungen angezogen. Die Versuchspflanzen wuchsen auf Platten, die in einem 60° Winkel ausgerichtet waren.

Bei Verwendung von Sulfat, Methylthioadenosin (MTA), Putrescin, Spermidin, Spermin oder 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC) für die Untersuchungen wurden die jeweiligen Chemikalien aus Stammlösungen in das verwendete Medium gegeben.

Die Endkonzentrationen der verwendeten Chemikalien im Medium sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Endkonzentrationen der im Medium verwendeten Zusätze

SUBSTANZ	ENDKONZENTRATION [μM]
Sulfat	500
MTA	500
Putrescin	10-300
Spermidin	10-300
Spermin	10-1000
ACC	10

Für die Behandlung mit 1 ppm Ethylen und 5 ppm 1-Methylcyclopropan (1-MCP) wurden die steril ausgebrachten Samen, in gasdichten Boxen angezogen.

Phänotypanalysen

Zur Analyse der Genfunktion durch Charakterisierung von T-DNA-Insertionslinien in Arabidopsis (Tabelle 1) wurden Untersuchungen an vier Tage alten Keimlingen und an 14 und 21 Tage alten Pflanzen durchgeführt. Wachstum und Entwicklung wurden mit einer Kamera (Canon PowerShot 210 HS) fotografiert und dokumentiert. Die Analyse der Expression von Reporter/GUS-Konstrukten erfolgte entweder an einem Binokular (Olympus, SZX9) oder einem Mikroskop (Olympus, BX41).

Für die Wachstumsmessungen an der Wurzel wurden 14 Tage alte, im Langtag angezogene, Arabidopsis Pflanzen fotografiert. Die Längen der Hauptwurzeln wurden mit Hilfe von Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) bestimmt.

Kreuzungen

Für Kreuzungsversuche wurden die Blüten von etwa sechs Wochen alten, homozygoten *mtn1-1* und *mtn1-2* Pflanzen emaskuliert und mit Pollen von *P_{DR5}::GUS* oder *P_{CycB1}::GUS* Pflanzen handbestäubt. Die doppelt heterozygoten Pflanzen der F₁-Generation wurden bis zur Samenreife angezogen. Die in der Folgegeneration (F₂) erhaltenen für *mtn1-1* und *mtn1-2* homozygoten Mutanten wurden über das reduzierte Wachstum bei Anzucht auf 500 µM MTA selektiert. Die so selektierten Pflanzen wurden auf Erde umgesetzt und für etwa vier Wochen angezogen. Junge Blätter und Apikalmeristeme dieser Pflanzen wurden auf GUS-Expression getestet. Pflanzen die GUS-Färbung zeigten, wurden bis zur Samenreife angezogen und ihre Nachkommen für die GUS-Expressionsanalysen verwendet.

Molekularbiologische Methoden

Isolierung genomischer DNA

Das verwendete Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert. Die Isolierung der DNA fand nach dem Protokoll von Weigel und Glazebrook (2002) statt. Etwa 100 mg des Pulvers wurden mit 400 µl DNA-Extraktionspuffer (200 mM Tris-HCl pH 7,5; 250 mM Natriumchlorid; 25 mM EDTA; 0,5% (w/v) SDS) versetzt und kurz geschüttelt. Die Proben wurden 5 Minuten bei 15300 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, im Verhältnis 1:1 mit Isopropanol gemischt und erneut für 5 Minuten bei 15300 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und erneut für 5 Minuten bei 15300 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl autoklaviertem H₂O resuspendiert. Isolierte DNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial von Arabidopsis erfolgte durch TRITM-Reagent nach Herstellerprotokoll (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland). Dazu wurde das Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und etwa 100 mg des Pulvers in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit 300 µl TRITM-Reagent versetzt. Die Proben wurden gevortext, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, mit 200 µl Chloroform versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 4°C und 15300 x g, die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Isolierte RNA wurde mit 125 µl Isopropanol und 125 µl hochkonzentrierter Salzlösung (800 mM Natriumcitrat, 1,2 M Natriumchlorid) gefällt. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 15300 x g und 4°C wurde das

Pellet mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und die Probe erneut für 5 Minuten bei 15300 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 20 µl H₂O resuspendiert und für 10 Minuten bei 60°C und 300 rpm in einem Thermoblock geschüttelt, um die RNA zu lösen.

Nach der RNA-Isolierung wurde eine DNase-Behandlung durchgeführt. Die isolierte RNA wurde für 1 Stunde bei 37°C und 300 rpm mit 1 µl DNaseI (1 U/µl) und 1 x DNaseI spezifischem Puffer (MBI-Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) inkubiert. Es folgte die Aufreinigung der RNA mit Phenol/Chloroform im Verhältnis 1:1. Nach kurzer Zentrifugation wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde im Verhältnis 1:1 mit Chloroform versetzt, erneut kurz zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der RNA wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen 100% (v/v) eiskaltem Ethanol über Nacht durchgeführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 15300 x g für 15 Minuten und 4°C, das Pellet wurde mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und erneut für 5 Minuten bei 15300 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 20 µl H₂O resuspendiert und die RNA für 10 Minuten bei 60°C und 300 rpm gelöst. Die Bestimmung von Konzentration und Reinheit der RNA erfolgte photometrisch an einem Spektralphotometer (NanoDrop ND-1000; NanoDrop Technologies, Wilmington, USA). Die RNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert. Jeweils 1 µg RNA wurde mit Hilfe der M-MuLV reversen Transkriptase (MBI-Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) und Oligo-dT-Oligonukleotiden (MBI-Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), nach einem modifizierten Protokoll von Murphy et al. (1993) revers transkribiert. Die erhaltene cDNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

Die aus RNA revers transkribierte cDNA wurde verwendet, um die Transkriptmengen spezifischer Gene in unterschiedlichen Genotypen über semiquantitative RT-PCR und quantitative Real Time PCR (qPCR) zu untersuchen. Als Kontrolle wurde die cDNA von *AtActin2* amplifiziert, dessen mRNA ubiquitär im Gewebe von Arabidopsis transkribiert wird. Die für die untersuchten Gene verwendeten, spezifischen Oligonukleotide sind in Tabelle 3 (semiquantitative RT-PCR) und Tabelle 4 (qPCR) dargestellt.

Polymerase Kettenreaktion

Mit der Polymerasen Kettenreaktion (PCR) wurden spezifische, DNA- oder cDNA-Sequenzen amplifiziert (nach Saiki et al., 1985). Es wurde die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* verwendet. DNA wird von dieser Polymerase mit einer Geschwindigkeit von einer Kilobase (kb) pro Minute synthetisiert. Folgende PCR-Ansätze und PCR-Programme wurden in dieser Arbeit verwendet:

PCR-Ansatz:

10 x PCR Puffer	2 µl
10 mM dNTPs	1 µl
10 µM Vorwärtsoligonukleotid	1 µl
10 µM Rückwärtsoligonukleotid	1 µl
100 ng DNA oder cDNA	1 µl
<i>Taq</i> -Polymerase 1 U/µl	1,5 µl
H ₂ O	12,5 µl

PCR-Programme:

Initiale Denaturierung	94°C	5 min	} 25-40 Zyklen
Denaturierung	94°C	50 s	
Anlagerung der Oligonukleotide	57 – 68°C	45 s bis 1 min	
Elongation des DNA-Stranges	72°C	30 s bis 3 min	
Abschließende Elongation	72°C	5 min	

Die Anlagerungstemperatur variierte, je nach verwendeten Oligonukleotiden, abhängig von der Länge und der Basenzusammensetzung der verwendeten Oligonukleotide. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die Länge der Elongationszeit wurde abhängig von der Länge der zu amplifizierenden Sequenz gewählt. Für die PCRs wurde ein

Biozym Peltier Thermo Cycler-200 (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) verwendet.

Tabelle 3: In der PCR verwendete Oligonukleotide

GEN	OLIGONUKLEOTID	SEQUENZ 5' - 3'
<i>AtMTN1</i>	AtMTN1 fw1	ATGGCTCCTCATGGAGATGGATTA
	AtMTN1 rv1	TTAAAGGTCCGAAAGGTTTCTC
<i>AtMTN2</i>	AtMTN2 fw1	ATGGAAGGTGTTATGGGTCAGG
	AtMTN2 rv1	TTAGAGGTCTGAGAGACATTTCC
<i>AtMTK</i>	AtMTK F1	CACCATGTCTTTTGAGGAGTTTACGCC
	AtMTK R1	TTAGCTTTGTTGTTGAATTGCTG
<i>AtSPDS1</i>	AtSPDS1 F1	ATGCTGCTGAAGGATCATACGA
	AtSPDS1 R1	TAGGATTTGCTACTATGCGAATG
<i>AtSPDS2</i>	AtSPDS2 F1	GCAAGTGCATTGTGATGAACC
	AtSPDS2 R1	AGGATATGAAATATGTGTAATGC
<i>AtSPMS</i>	AtSPMS F1	CTTGATGATTGAAAAGGTTCTGA
	AtSPMS R1	AGAGCGAGAGTGAGGTTCC
<i>AtACL5</i>	AtACL5 F1	CGCTCCTTCTTTCGTCTCTG
	AtACL5 R1	ACCGGAATAACTTGAGGGAAG
<i>AtSAMDC1</i>	SAMDC1-1 F1	GCGGCTACTCTATGAACTCA
	SAMDC1-1 R1	CTAGATTCCCTCGTCCTTCTC
<i>AtSAMDC1</i>	SAMDC1-2 F1	ATGGCCTTATCTGCAATCGG
	SAMDC1-2 R1	CAGAGTTATCAGTCATTGAC
<i>AtSAMDC2</i>	SAMDC2 F1	ACTTTCTTTGAGCCTGGTC
	SAMDC2 R1	CTATTCCTTCTCGTCCTCGC
<i>AtSAMDC4</i>	SAMDC4 F1	ACTCACACACAAACACA
	SAMDC4 R1	TGATGGGTTATTAGAAGGCG
<i>AtSDT</i>	AtSDT F1	ATGCCGATTCACATAGGTTCA
	AtSDT R1	GTTGGTAAGTAAGGCGAAGCAG
<i>AtSCT</i>	AtSCT F1	AAGTTGCTTTGCGGCTTGTA
	AtSCT R1	CGCTGGGTCAATGGTCGTAA
<i>AtActin2</i>	AtActin2 F1	CAAAGACCAGCTCTTCCATCG
	AtActin2 R1	CTGTGAACGATTCCTGGACCT
	Salk_LBb	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT
	GABI-KAT_LB	ATTGACCATCATACTCATTGC
	SAIL_LB	GCCTCGCTAGTCAAAAGTGACCA
	SM_LB	CGTGAAGTTTCTCATCTAAGCCCC

Die in der PCR erhaltenen Produkte wurden über 1%ige (w/v) Agarosegelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1 x Tris-Acetate-EDTA-Puffer (40 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8; 0,11% (v/v) Eisessig). Die

Produkte der PCR wurden mit 1 x DNA-Ladepuffer (0,1% (w/v) Bromphenolblau; 50% (w/v) Glycerin) versetzt und jeweils 15 µl auf ein 1%iges Agarosegel mit 0,01% (v/v) Ethidiumbromid aufgetragen. Zur Bestimmung der Größe und der Konzentration der erhaltenen Banden diente die „Smart Ladder“ (Eurogentec, Seraing, Belgien). Die in dieser Arbeit verwendeten T-DNA-Insertionslinien (Tabelle 1) wurden durch PCR-Analysen auf Reinerbigkeit getestet. Dazu wurden für jede Pflanze zwei PCRs durchgeführt. Das Wildtypallel wurde mit wildtypspezifischen Oligonukleotiden nachgewiesen, die T-DNA-Insertion wurde mit einem wildtypspezifischen und einem insertionsspezifischen Oligonukleotid nachgewiesen.

Transkriptanalysen über quantitative Real Time PCR

Die quantitative Real Time PCR (qPCR) wurde in einem AB7300 Real-Time PCR Gerät (Applied Biosystems, Carlsbad, Kalifornien, USA) durchgeführt. Die Reaktionen fanden in einem Volumen von 25 µl unter der Verwendung von 12,5 µl eines SYBR Green Mastermixes (Quiagen, Hilden, Deutschland) statt. Ein Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

100 ng cDNA	1 µl
10 µM Vorwärtsoligonukleotid	1,5 µl
10 µM Rückwärtsoligonukleotid	1,5 µl
SYBR Green Mastermix	12,5 µl
H ₂ O	8,5 µl

Die verwendeten, genspezifischen Oligonukleotide amplifizierten jeweils einen Bereich von 150–200 Basenpaaren (Tabelle 4). Die verwendete Anlagerungstemperatur lag für alle verwendeten Oligonukleotide bei 60°C.

Tabelle 4: Zur Amplifikation in der qPCR verwendete Oligonukleotide

GEN	OLIGONUKLEOTID	SEQUENZ 5' - 3'
<i>AtMTN1</i>	AtMTN1qPCRF	CCACGCAAGATGAAACATTG
	AtMTN1qPCRR	CTCTAATGCAGCGGTCACAA
<i>AtMTN2</i>	AtMTN2qPCRF	ATCCACTGGCGATTCTATGG
	AtMTN2qPCRR	TTGGTCTATTGCCATCCACA
<i>AtGAPC</i>	AtGAPCqPCRF	ATCAACGAGCAATCCGAATCG
	AtGAPCqPCRR	AAGTCGACCACACGGGAAT
<i>AtActin</i>	AtActin2 F1	CAAAGACCAGCTCTTCCATCG
	AtActin2qPCRR1	GTTGTCTCGTGGATTCCAGCA

Das qPCR-Programm wurde mit einem Initiierungsschritt von zwei Minuten bei 50°C gestartet, um die im Mastermix enthaltene Polymerase zu aktivieren. Es folgten 15 Minuten bei 95°C zur Trennung der doppelsträngigen cDNA. Der für die Untersuchungen verwendete Amplifikationszyklus wurde mit 20 Sekunden bei 95°C gestartet. Darauf folgten eine Minute bei 60°C zur Anlagerung der verwendeten Oligonukleotide an die cDNA und 35 Sekunden bei 72°C zur Strangverlängerung durch die verwendete Polymerase. Der Amplifikationszyklus wurde 40 Mal wiederholt. Zum Abschluss wurde ein Dissoziationsschritt durchgeführt. Dieser wird bei der Verwendung von SYBR Green als Marker benötigt. Der Dissoziationsschritt bestand aus 15 Sekunden bei 95°C, 30 Sekunden bei 60°C und weiteren 15 Sekunden bei 95°C.

Die Quantifizierung der Proben erfolgte über die Normalisierung der CT-Werte, anhand der amplifizierten Kontrollgene *AtActin2* und *AtGAPC*. Dazu wurde der Fluoreszenzschwellenwert (CT-Wert), ermittelt. Über die Berechnung von $2^{-\Delta Ct}$ wurde die Regulation der verschiedenen Transkripte analysiert. ΔCt wurde wie folgt berechnet:

$$\Delta Ct = (((AtActin(Kontrolle) - Gen(Kontrolle)) + (AtGAPC(Kontrolle) - Gen(Kontrolle))) / 2) - (((AtActin(Behandlung) - Gen(Behandlung)) + (AtGAPC(Behandlung) - Gen(Behandlung))) / 2)$$

Für jedes verwendete Paar von Oligonukleotiden wurde zur Negativkontrolle eine Reaktion mit Wasser anstelle von cDNA angesetzt.

Extraktion freier Polyamine aus Arabidopsis

Zur Isolierung der freien Polyamine wurde das Frischgewicht des eingesetzten Pflanzenmaterials bestimmt und die freien Polyamine nach dem Protokoll von Morgan (1998) isoliert. Dazu wurde das Pflanzenmaterial in 500 µl 5%iger (v/v) Perchlorsäure gemörstert. Danach wurden die Proben in 2 ml 5% (v/v) Perchlorsäure aufgenommen und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 30 Minuten bei 4°C und 6000 g. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, 2 ml 2 M Natriumhydroxid dazugegeben und kurz geschüttelt. Es wurden 10 µl Benzoylchlorid hinzugegeben und die Proben für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden 2 ml gesättigtes Natriumchlorid hinzugegeben und kurz geschüttelt. Die Extraktion der Polyamine erfolgte durch Zugabe von 2 ml Chloroform, kurzem Schütteln und einer Zentrifugation für zwei Minuten bei 6000 g und 4°C. Die untere, nicht wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt. Die Proben wurden durch Zugabe von 2 ml H₂O, kurzem Schütteln und einer Zentrifugation für zwei Minuten bei 4°C und 6000 g gewaschen. Die untere, nicht wässrige Phase wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die angereicherten Polyamine wurden bis zu ihrer Messung bei -20°C gelagert.

Zur Bestimmung der extrahierten, freien Polyamine wurden die bei -20°C gelagerten Proben aufgetaut und mit 50 µl Methanol versetzt. Jeweils 15 µl wurden für die Messungen verwendet. Die Messungen fanden an einer Beckman Coulter Gold Systems HPLC unter Verwendung eines System Gold UV/VIS Detector 168 statt. Zur Bestimmung des Gehaltes von Putrescin, Spermidin und Spermin in den Proben wurden Eichreihen der Reinsubstanzen verwendet. Hierzu wurden die Peakflächen verschiedener Konzentrationen bis zu 1 mmol Putrescin, Spermidin und Spermin bestimmt. Zusätzlich zu den so erhaltenen Eichgeraden für die Berechnung der Polyamingehalte konnten die Retentionszeiten der einzelnen Polyamine bestimmt werden. Die gemessenen Retentionszeiten und die Werte zur Berechnung der Polyamingehalte wurden in das Programm ProteomLabPF2D eingegeben und die Polyamingehalte in den Proben im weiteren von dem Programm berechnet.

Bestimmung der Ethylenproduktion über Gaschromatographie

Die Messung von Ethylen fand nach dem Protokoll von Vogel et al. (1998) statt. Detektiert wurde Ethylen in den untersuchten Proben mit einem GC14B Gaschromatographen (Shimadzu, Hamburg, Deutschland), über einen Flammenionisationsdetektor (FID). Durch Verwendung einer Eichgeraden mit 0, 1, 2, 4 und 8 ppm Ethylen wurde die Menge an Ethylen in den untersuchten Proben bestimmt.

Analyse der Schwefelmetabolite

Das verwendete Wurzelmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörsernt und jeweils 100 mg des Pulvers in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Die Metabolite wurden mit 500 µl 0,1 M HCL für 15 Minuten bei 4°C extrahiert. Es folgten zwei Zentrifugationen bei 16400 g und 4°C für 10 Minuten, der Überstand wurde jeweils in ein neues Reaktionsgefäß überführt. SAM/dSAM, MTA, ADT und ATP wurden mit Chloracetaldehyd derivatisiert und über HPLC aufgetrennt. Die Quantifizierung wurde wie in Rzewuski et al. (2007) beschrieben von Herrn Dr. Markus Wirtz (Universität Heidelberg) durchgeführt. Cystein und GHS wurden mit Monobromobimane über *reverse phase chromatography* (Wirtz et al., 2004) detektiert und mit Hilfe der Millenium32 Software ausgewertet.

Analysen der Promotor::GUS-Linien

Das Pflanzenmaterial wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in 90%igem (v/v) Aceton geerntet und bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Das Aceton wurde abgenommen, die Proben mit 500 µl 0,5 M Natriumphosphatpuffer (pH 7) versetzt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln bei 300 rpm inkubiert. Der Natriumphosphatpuffer wurde abgenommen, durch GUS-Färbelösung bestehend aus 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0), 0,2% (v/v) Triton-X100, 2 mM Kaliumhexacyanoferrat(II), 2 mM Kaliumhexa-

cyanoferrat(III) und 2 mM X-Gluc (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β -D-Glucuronid), ersetzt und die Proben für 15 Minuten vakuuminfiltiert. Anschließend wurden die Proben für 1 bis 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Dauer der Inkubation war abhängig von den verwendeten Promotor::GUS Linien. Nach Beenden der Inkubation wurde die Färbelösung entfernt und durch 20%iges (v/v) Ethanol ersetzt. Es folgte eine aufsteigende Ethanolreihe von 20% (v/v), 30% (v/v), 50% (v/v) und 70% (v/v), bei der die Proben jeweils für 30 Minuten geschüttelt wurden. Es wurde erneut 70%iges (v/v) Ethanol hinzugegeben und die Proben geschüttelt, bis diese vollständig entfärbt waren. Darauf folgte eine absteigende Ethanolreihe, zur Rehydrierung des Pflanzenmaterials, von 70% (v/v), 50% (v/v), 30% (v/v) und 20% (v/v). Anschließend wurden die Pflanzenteile in Wasser für 30 Minuten geschüttelt. Die Pflanzenteile wurden mit Klärlösung (6 Teile Chloralhydrat, 2 Teile Wasser, 1 Teil Glycerin) auf Objektträgern eingebettet. Die Analyse der Promotor::GUS Linien erfolgte unter einem Binokular oder Mikroskop.

MTN-Enzymanalysen

Isolierung von Gesamtprotein aus Arabidopsis

Zur Isolierung von Gesamtprotein wurde das Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörst und circa 100 mg des Pulvers wurden mit 200 μ l 0,05 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7) für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 20 Minuten bei 15300 x g und 4°C. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsdorfgefäß überführt und auf Eis gehalten.

Zur Bestimmung der Konzentration an Gesamtprotein in den isolierten Pflanzenextrakten, wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford (1976) durchgeführt. Es wurden jeweils 5 μ l des Pflanzenextrakts mit 795 μ l H₂O und 200 μ l RotiQuant (Roth, Karlsruhe, Deutschland) gemischt. Nach einer 20 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Konzentration photometrisch bestimmt. Jede Probe wurde einer Dreifachbestimmung unterzogen.

MTA-Nukleosidase Assay

Zur Bestimmung der MTN-Aktivität in Pflanzenextrakten aus Arabidopsis wurde ein gekoppelter Assay nach Lee et al. (2005) verwendet. Hierbei katalysiert die MTA-Nukleosidase die Umsetzung von MTA zu MTR und Adenin. Adenin wird von der im Assay verwendeten Xanthin-Oxidase zu Dihydroxyadenin umgesetzt. Dihydroxyadenin oxidiert das schwach farbige Tetrazoliumsalz INT (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-Nitrophenyl)-5-Phenyltetrazoliumchlorid). Die Oxidation führt zu einem violetten Farbumschlag, der im Bereich des sichtbaren Lichts bei 470 nm zu messen ist.

Die Bestimmung der MTN-Aktivität in isolierten Pflanzenextrakten aus Arabidopsis wurde mit 10-20 µg Gesamtprotein durchgeführt. Dazu wurde das jeweilige Volumen an Pflanzenextrakt mit 0,05 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7) auf 20 µl aufgefüllt und mit 780 µl Reaktionspuffer (200 µM MTA; 0,2 Units Xanthin-Oxidase; 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7); 2,5 mM INT) in einer Küvette gemischt.

Die Datenaufnahme erfolgte an einem DU 530 Life Science UV/VIS Spektrometer (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) in 20 Minuten Intervallen über einen Zeitraum von zwei Stunden. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ beträgt $15,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Für die Berechnung der spezifischen Enzymaktivitäten wurden der Extinktionskoeffizient, die Steigung, der aus den Messpunkten erhaltenen Gerade, die eingesetzte Proteinmenge und das in der Reaktion verwendete Gesamtvolumen benötigt. Spezifische Enzymaktivitäten wurden wie folgt berechnet:

$$\text{MTN-Aktivität} = (\text{Steigung [Extinktion/min]} / \text{Extinktionskoeffizient [mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}]) \times \text{Proteinmenge [mg]} \times \text{Gesamtvolumen [\mu l]} = \text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Protein}$$

SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese nach Laemmli (1970), dient der Auftrennung von Proteinen der Größe nach. Dazu wurden 10-15 µg Gesamtprotein in einem Volumen von 20 µl mit denaturierendem Ladepuffer aus 40% (v/v) Glycerin, 20% (v/v) β-Mercaptoethanol, 4% (w/v) Natriumdodecylsulfat, 250 mM Tris-HCl (pH 6,8) und einer Spatelspitze Bromphenolblau versetzt und für 3 Minuten bei 96°C aufgeköcht.

Das verwendete Polyacrylamidgel, bestand aus einem Trenngel mit 0,375 M Tris-HCl (pH 8,8), 12,5% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 0,04% (w/v) APS und 0,122% (v/v) TEMED und einem Sammelgel mit 0,125 M Tris-HCl (pH 6,6), 4,8% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 0,15% (w/v) APS und 0,15% (v/v) TEMED. Die in den Probe enthaltenen Proteine, wurden auf einem 10x10 cm Gel unter Verwendung von Laemmli-Puffer aus 0,25 M Tris, 1,92% (w/v) Glycin und 1% (w/v) SDS und durch das Anlegen einer Spannung von 0,1 mA/cm² für 10 Minuten und 0,35 mA/cm² für eine Stunde, ihrer Größe nach aufgetrennt. Das erhaltene SDS-Gel konnte für eine Coomassie-Färbung oder einen Westernblot verwendet werden.

Westernblot

Der verwendete semidry-Westernblot wurde nach Towbin et al. (1992) durchgeführt. Der Blot setzte sich wie folgt zusammen: Auf der Unterseite der Blot-Apparatur (PEQLAB, Erlangen, Deutschland) wurden zuerst sechs Blätter Whatmanpapier, getränkt in Anodenpuffer I aus 0,3 M Tris-HCl (pH 10,4) und 20% (v/v) Methanol, gestapelt. Darüber befanden sich drei Blätter Whatmanpapier getränkt in Anodenpuffer II bestehend aus 25 mM Tris-HCl (pH 10,4) und 20% (v/v) Methanol. Danach folgte eine PVDF Membran (GE Healthcare, Uppsala, Schweden), welche zuvor 30 Sekunden in Methanol, 5 Minuten in H₂O und 15 Minuten in Anodenpuffer II äquilibriert wurde. Auf die Membran wurde das SDS-Gel gelegt und darüber wurden sechs weitere Lagen Whatmanpapier getränkt in Kathodenpuffer, bestehend aus 25 mM Tris-HCl

(pH 9,4), 40 mM Aminocaprinsäure und 20% (v/v) Methanol, platziert. Der Proteintransfer, auf die 6x9 cm große Membran, erfolgte bei 0,8 mA/cm² für eine Stunde.

Die Übertragungseffizienz wurde durch Färbung mit Ponceau-Rot bestehend aus 5% Essigsäure und 0,01% (w/v) Ponceau S, überprüft und die Banden des Proteinstandards markiert. Es folgte eine Inkubation der Membran, mit 5% Milchpulver in TBS(T+B), bestehend aus 20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 137 mM Natriumchlorid, 0,1% (v/v) Tween 20 und 0,03% (w/v) BSA, für eine Stunde bei Raumtemperatur, zum Abblocken der Membran. Die PVDF Membran wurde anschließend zwei Mal für fünf Minuten mit 70 ml TBS(T+B) gewaschen und über Nacht bei 4°C mit dem ersten Peptid-Antikörper, gegen MTN1 (MAPHGDGLSDIEEPEVDAQSE) aus Kaninchen, in einer Verdünnung von 1:2000 inkubiert. Es folgten mehrere Waschschrte in TBS(T+B) für 2 x 3 Minuten in 70 ml, 15 Minuten in 150 ml und; 3 x 5 Minuten in 70 ml, bevor die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Peroxidasegekoppelten zweiten Antikörper, gegen Kaninchen IgG (GE Healthcare, Uppsala, Schweden), in einer Verdünnung von 1:50000 inkubiert wurde. Darauf folgten mehrere Waschschrte in TBS(T+B) für 2 x 3 Minuten in 70 ml, 15 Minuten in 150 ml und 3 x 5 Minuten in 70 ml, bevor die Membran für drei Minuten mit dem Substrat der an den zweiten Antikörper gekoppelten Peroxidase aus einem ECL-Kit (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) behandelt wurde. Anschließend wurde die Membran mit einer Plastikfolie abgedeckt und unter Rotlicht ein HyperfilmTM (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) aufgelegt. Entwickelt wurde der Röntgenfilm nach Exposition mit einem automatischen Röntgenfilmentwickler (Curix von AGFA, Köln, Deutschland).

Als Beladungskontrolle diente die Färbung mit Coomassie (Chen et al., 1993). Zur Färbung der Proteine mit Coomassie, wurden das SDS-Gel oder die PVDF Membran für 15 Minuten in Färbelösung mit 50% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure und 0,25% (w/v) Coomassie R 250 inkubiert. Zur Entfärbung wurde das Gel oder die Membran so lange in Entfärbelösung mit 40% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure und 3% (w/v) Glyzerin inkubiert, bis Banden sichtbar wurden.

Untersuchungen zur Translationseffizienz und zum Proteinabbau

Sowohl für die Untersuchungen zur Translationseffizienz, als auch für die Analysen zum Proteinabbau wurden 14 Tage alte Pflanzen verwendet. Die Pflanzen wurden auf 0,5 x MS-Medium wie beschrieben angezogen und dann in Flüssigkultur mit 0,5 x MS Medium und 1,5% (w/v) Saccharose umgesetzt. Zur Untersuchung der Translationseffizienz wurden 50 mM MG132 als Stammlösung in DMSO gelöst und in einer Endkonzentration von 100 µM für die Untersuchungen verwendet. Die Analysen zum Proteinabbau wurden mit Cycloheximid (CHX) durchgeführt. Dazu wurden 100 mM CHX in Ethanol gelöst und in einer Endkonzentration von 100 µM für die Analysen verwendet.

Datenbankrecherchen

Die vollständigen Sequenzen der in dieser Arbeit untersuchten Gene und Proteine wurden aus den Datenbanken Tair (www.arabidopsis.org) und Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) erhalten. Promotoranalysen wurden mit PlantPAN ([http:// plantpan.mbc.nctu.edu.tw/](http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw/)) durchgeführt. Analysen der Proteinprimärsequenzen auf potentielle Ubiquitinierungsstellen fanden mit CKSAAP (http://protein.cau.edu.cn/cksaap_ubsite/) und UbPred (www.ubpred.org) statt. Untersuchungen zu potentiellen Sumoylierungsstellen wurden mit SumoPlot (<http://www.abgent.com/sumoplot/>) und SUMOFI ([http://cbg.garvan.unsw.edu.au/ sumofi/form.do](http://cbg.garvan.unsw.edu.au/sumofi/form.do)) durchgeführt.

ERGEBNISSE

Inhibition des Wurzelwachstums von *mtn1* durch MTA

Um das Recycling von Methionin in Pflanzen zu untersuchen, wurde in früheren Arbeiten die Aktivität des Methioninzyklus an Hand der Methioninzyklusmutanten *mtn1-1*, *mtn1-2*, *mtn2-1* *mtn2-2* und *mtk* analysiert. (Bürstenbinder et al., 2007; Bürstenbinder et al., 2010). Hier konnte gezeigt werden, dass Wachstum auf MTA das Keimlings- und Sprosswachstum hemmt.

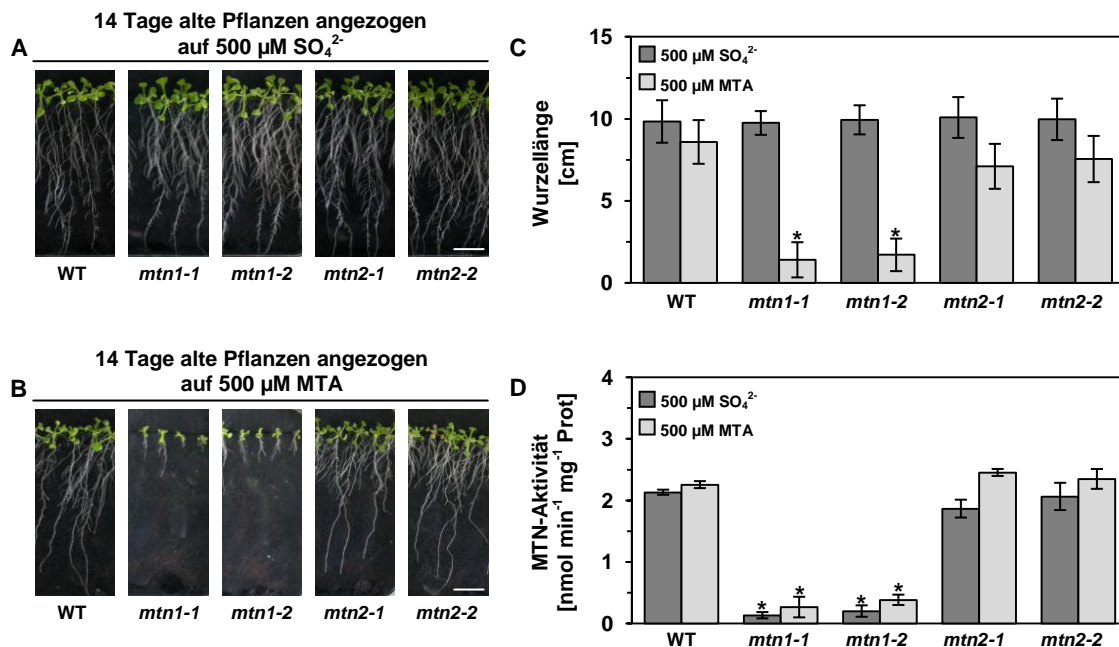


Abbildung 4: MTA inhibiert das Wurzelwachstum in *mtn1* Mutanten.

(A+B) Phänotyp, (C) Wurzellänge und (D) MTN-Aktivität aus Wurzeln von 14 Tage alten Pflanzen. Wildtyp (WT), *mtn1-1*, *mtn1-2*, *mtn2-1* und *mtn2-2* Pflanzen wurden auf schwefelreduziertem 0,5 x MS Medium mit (A) 500 µM SO_4^{2-} oder (B) 500 µM MTA angezogen. Für (A) und (B) sind repräsentative Pflanzen aus drei biologischen Wiederholungen gezeigt. (C) Die Längen der Hauptwurzeln wurden mit ImageJ bestimmt (\pm Standardabweichung, $p < 0,05$, ANOVA) und stammen aus drei biologischen Wiederholungen mit je $n \geq 10$. (D) MTN-Aktivitäten aus den Wurzeln (\pm Standardabweichung, $p < 0,05$, ANOVA) stammen aus drei biologischen Wiederholungen mit je $n = 3$. Signifikante Unterschiede in Wurzellänge und MTN-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp auf 500 µM SO_4^{2-} sind mit einem (*) markiert. Die Größenbalken in A und B repräsentieren 1 cm.

Um die Auswirkungen und den Einfluss des Methioninzyklus auf Wachstum und Entwicklung von Arabidopsiswurzeln zu untersuchen, wurden Wildtyppflanzen und die Methioninzyklusmutanten *mtn1-1*, *mtn1-2*, *mtn2-1* und *mtn2-2*, untersucht. In *mtn1-1*, *mtn1-2*, *mtn2-1* und *mtn2-2* sind jeweils entweder MTN1 oder MTN2 herunter reguliert. Die Untersuchungen wurden an 14 Tage alten Pflanzen durchgeführt. Diese wurden auf schwefelreduziertem MS Medium mit 500 μM Sulfat oder 500 μM MTA angezogen.

Das Wurzelwachstum von Wildtyppflanzen war im Vergleich zur Anzucht auf 500 μM SO_4^{2-} bei Anzucht auf 500 μM MTA um 10% reduziert (Abb. 4C). Die MTN-Aktivität war im Wildtyp, bei Wachstum auf 500 μM MTA, im Vergleich zum Wachstum auf 500 μM Sulfat, um 5% erhöht (Abb. 4D). Die *mtn1-1* und *mtn1-2* Mutanten zeigten auf 500 μM MTA (Abb. 4B), im Vergleich zu 500 μM SO_4^{2-} ein reduziertes Wachstum (Abb. 4A). Die Messung der *mtn1-1* und *mtn1-2* Wurzellängen ergab, bei Wachstum auf 500 μM MTA eine signifikant verkürzte Wurzellänge, im Vergleich zu den Wurzeln der Wildtyppflanzen (Abb. 4C). Die MTN-Aktivität in den Wurzeln der *mtn1-1* und *mtn1-2* Mutanten war, unabhängig vom Medium, signifikant geringer, als die MTN-Aktivität in den Wurzeln des Wildtyps, der *mtn2-1* und der *mtn2-2* Mutanten (Abb. 4D).

Die *mtn2-1* und *mtn2-2* Mutanten zeigten, im Vergleich zum Wildtyp, keine Unterschiede, im Wachstum oder der Entwicklung. (Abb. 4A+B). Die Wurzellänge der *mtn2-1* und der *mtn2-2* Mutanten war bei Wachstum auf 500 μM MTA im Vergleich zum Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} , um jeweils 30% (*mtn2-1*) oder 25% (*mtn2-2*) verringert (Abb. 4C). Die Wurzeln der *mtn2-1* und *mtn2-2* Mutanten besaßen auf 500 μM MTA eine um 30% (*mtn2-1*) und 10% (*mtn2-2*) erhöhte MTN-Aktivität, im Vergleich zur MTN-Aktivität bei Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} (Abb. 4D). Alle untersuchten Genotypen zeigten bei Wachstum auf MTA eine Wachstumsreduzierung. Dieser Effekt ist in den *mtn1* Mutanten stärker ausgeprägt als im Wildtyp oder den *mtn2* Mutanten.

Methionin, S-Adenosylmethionin und Methylthioadenosin akkumulieren in der Wurzel bei Wachstum auf MTA

Aus früheren Arbeiten ist bereits bekannt, dass S-Adenosylmethionin (SAM)/decarboxyliertes S-Adenosylmethionin (dSAM) und Methylthioadenosin (MTA) in vier Tage alten *mtn1-1* und *mtn1-2* Keimlingen bei Wachstum auf 500 μM MTA, im Vergleich zum Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} , akkumulieren. Dies gilt auch für die Sprosse von drei Wochen alten *mtn1-1* und *mtn1-2* Pflanzen (Bürstenbinder et al., 2010). Um zu untersuchen, ob es in den Wurzeln der *mtn1-1* und *mtn1-2* Mutanten ebenso zu einer Veränderung der Metabolite bei Wachstum auf 500 μM MTA, im Vergleich zum Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} kommt, wurden die Wurzeln von drei Wochen alten Pflanzen analysiert.

In den Wurzeln von drei Wochen alten von Wildtyp, *mtn1-1*, *mtn1-2*, *mtn2-1*, *mtn2-2* und *mtk* Pflanzen akkumulierten die Metabolite Methionin (Met), SAM/dSAM und MTA bei Anzucht auf 500 μM MTA, im Vergleich zu den Wurzeln der auf 500 μM SO_4^{2-} angezogenen Pflanzen (Abb. 5A+B+C). In den Wurzeln der *mtk* Mutanten war keine Akkumulation von Met, SAM/dSAM oder MTA, bei Wachstum auf 500 μM MTA im Vergleich zum Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} , zu beobachten (Abb. 5A+B+C). Der Cysteingehalt in den Wurzeln der Wildtyp, *mtn1-1*, *mtn1-2*, *mtn2-1*, *mtn2-2* und *mtk* Pflanzen zeigte keine signifikanten Unterschiede bei Wachstum auf 500 μM MTA im Vergleich zum Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} (Abb. 5D).

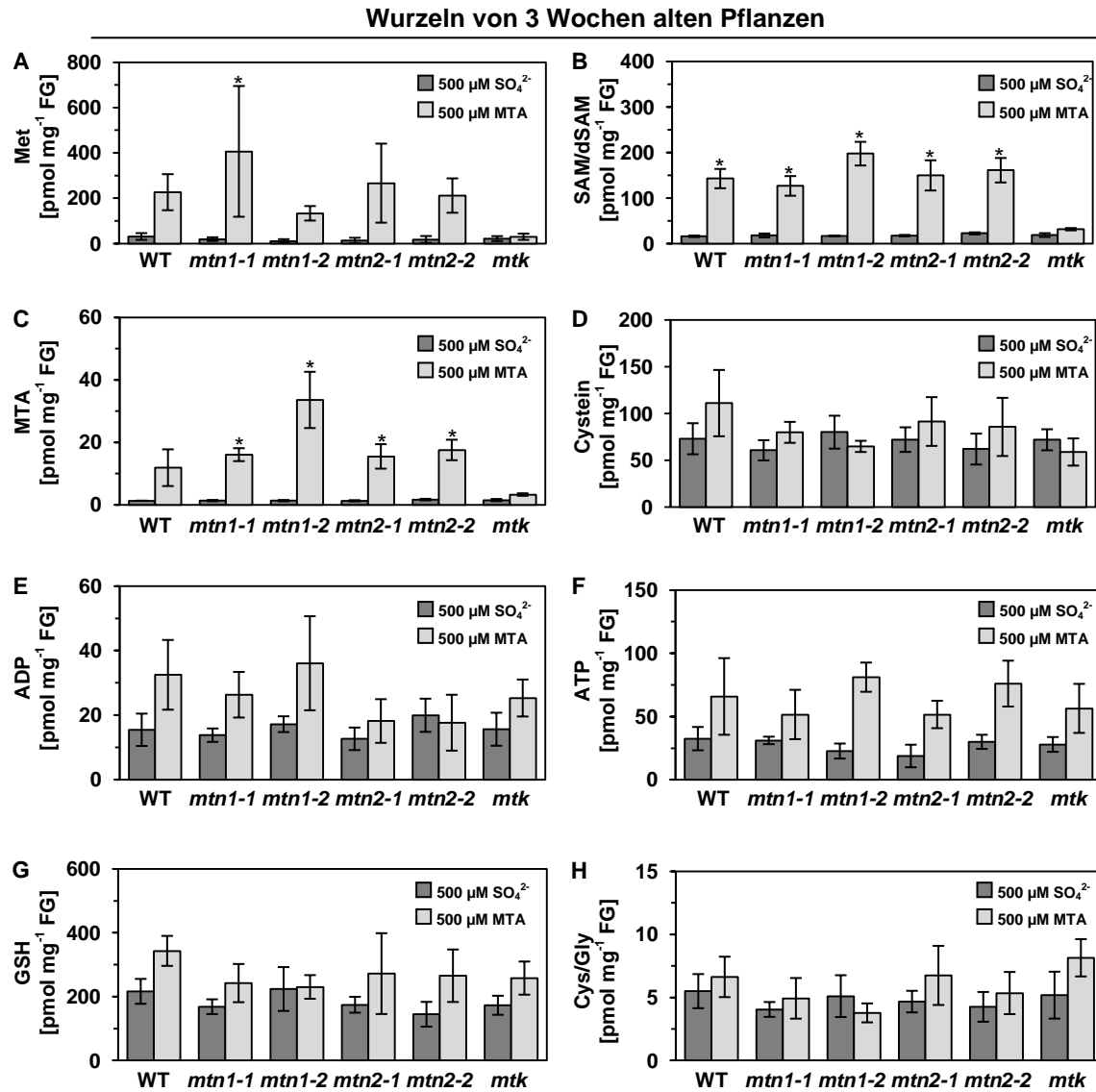


Abbildung 5: Methionin, SAM/dSAM und MTA akkumulieren in Wurzeln bei Wachstum auf MTA.

(A) Methionin, (B) SAM/dSAM, (C) MTA, (D) Cystein, (E) ADP, (F) ATP, (G) GHS und (H) Cys/Gly Gehalte aus den Wurzeln von drei Wochen alten Wildtyp (WT), *mtn1-1*, *mtn1-2*, *mtn2-1* *mtn2-2* und *mtk* Pflanzen. Die Pflanzen wurden auf schwefelreduziertem 0,5 x MS Medium mit 500 μM SO₄²⁻ oder 500 μM MTA angezogen. Die Metabolitgehalte (±Standardabweichung, p<0,001, ANOVA) stammen aus vier biologischen Wiederholungen. Signifikante Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp auf Sulfat sind mit einem (*) gekennzeichnet.

In den Wurzeln der Wildtyppflanzen war der Gehalt an ADP und ATP bei Wachstum auf 500 μM MTA im Vergleich zum Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} , erhöht (Abb. 5E+F). Der Gehalt von ADP und ATP in den Wurzeln der *mtn1-1*, *mtn1-2*, *mtn2-1* und *mtk* Pflanzen war unverändert im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 5E+F). In den Wurzeln der *mtn2-2* Mutanten konnte im Durchschnitt keine Erhöhung der ADP Gehalte, bei Wachstum auf 500 μM MTA, im Vergleich zum Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} gemessen werden (Abb. 5E). Der Gehalt an ATP in den Wurzeln der *mtn2-2* Mutanten war im Vergleich zum Wildtyp unverändert (Abb. 5F).

Glutathion (GSH) akkumulierte in den Wurzeln der Wildtyppflanzen, der *mtn1-1*, der *mtn2-1*, der *mtn2-2* und der *mtk* Mutanten bei Wachstum auf 500 μM MTA, im Vergleich zum Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} . In den Wurzeln der *mtn1-2* Mutanten war im Durchschnitt keine Akkumulation zu beobachten (Abb. 5G). Das Verhältnis von Cystein zu Glycin wurde durch die Anzucht auf 500 μM MTA im Vergleich zu 500 mM SO_4^{2-} bei Wildtyp, *mtn1-1*, *mtn2-1*, *mtn2-2* und *mtk*, leicht in die Richtung des Cysteins verschoben. Bei *mtn1-2* ist es im Durchschnitt dagegen umgekehrt hier gab es auf Anzucht mit 500 μM MTA eine leichte Verschiebung in die Richtung des Glycins (Abb. 5H).

Von den analysierten Metaboliten zeigten SAM und Methionin, die direkten Vorläufer des MTA, die größten Veränderungen beim Wachstum auf MTA (Abb. 5A+B). Cystein- und Glutathiongehalte wurden vom Wachstum auf MTA nicht verändert (Abb. 5D+G). Die Gehalte von ADP und ATP waren tendenziell erhöht, wenn die Pflanzen auf MTA angezogen wurden (Abb. 5E+F).

Der Ethylensignalweg ist nicht verantwortlich für das reduzierte Wachstum der *mtn1-1* Mutanten

Ethylen beeinflusst das Wachstum der Wurzeln. Mutanten, die viel Ethylen produzieren, wie die *eto3* Mutante, oder einen dauerhaft induzierten Ethylensignalweg besitzen, wie die *ctr1* Mutante, haben ein reduziertes Wurzelwachstum. Um zu untersuchen, ob das reduzierte Wurzelwachstum der *mtn1-1* Mutanten durch Veränderungen im Ethylensignalweg hervorgerufen wird, wurden Wildtyppflanzen und *mtn1-1* Mutanten für 14 Tage auf schwefelreduziertem Medium mit 500 μ M MTA oder mit 500 μ M MTA und 5 ppm 1-MCP angezogen. 1-MCP ist ein Inhibitor der Ethylenperzeption, der an die Ethylenrezeptoren bindet und so die Weiterleitung des Ethylensignals verhindert.

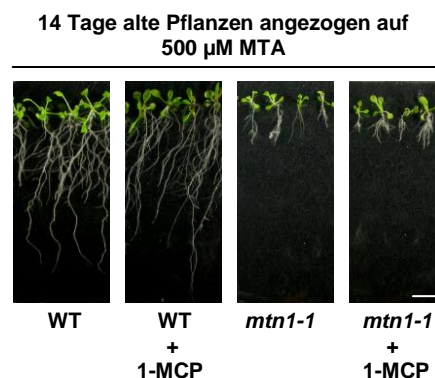


Abbildung 6: Eine erhöhte Ethylenproduktion ist nicht verantwortlich für das reduzierte *mtn1-1* Wurzelwachstum.

Wildtyppflanzen (WT) und *mtn1-1* Mutanten wurden für 14 Tage auf schwefelreduziertem Medium mit 500 μ M MTA angezogen. Zusätzlich wurden einige Pflanzen, ab dem fünften Tag nach der Keimung, mit 5 ppm 1-MCP behandelt. Gezeigt sind repräsentative Pflanzen aus drei biologischen Wiederholungen. Der Größenbalken repräsentiert 1 cm.

14 Tage alte Wildtyppflanzen zeigten keine Veränderung in Wachstum und Entwicklung bei Behandlung mit 5 ppm 1-MCP im Vergleich zu den unbehandelten Pflanzen (Abb. 6). Die *mtn1-1* Pflanzen waren im Vergleich zum Wildtyp im Wachstum reduziert, die Behandlung mit 5 ppm 1-MCP führte zu keiner Veränderung in Spross- und Wurzelwachstum im Vergleich zu den unbehandelten Pflanzen (Abb. 6).

Veränderungen in der Auxinverteilung oder der Zellteilung sind nicht verantwortlich für das reduzierte Wurzelwachstum der *mtn1* Mutanten

Um zu untersuchen, ob das veränderte Wurzelwachstum der *mtn1* Mutanten auf eine veränderte Auxinverteilung oder auf Veränderungen in der Zellteilungsrate zurückzuführen ist, wurden Kreuzungen zwischen *mtn1-1* und *mtn1-2* mit der $P_{DR5}::GUS$ Linie und der $P_{CycB1}::GUS$ Linie hergestellt. Der synthetische *DR5* Promotor wird zum Nachweis von aktivem Auxin im Gewebe und Auxin-induzierter Genexpression verwendet (Sabatini et al., 1999; Friml et al., 2002; Marchant et al., 2002). Durch die Promotoraktivität von *CycB1* werden Zellen nachgewiesen, die sich im Übergang von der G2 in die M Phase befinden. Diese Zellen befinden sich kurz von der Zellteilung (Hemerly et al., 1992)

Die Samen der F_1 -Generation wurden auf 500 μ M MTA angezogen und auf den *mtn1* Phänotyp selektiert. Die Homozygotie von *mtn1* wurde über PCR kontrolliert. Anschließend wurde die GUS-Aktivität der selektierten Pflanzen über GUS-Färbung von Blütenknospen untersucht. Die Samen der F_2 -Generation wurden für die folgenden Analysen verwendet. Die Pflanzen wurden für 14 Tage auf schwefelreduziertem Medium mit 500 μ M SO_4^{2-} oder MTA im Langtag angezogen. $P_{DR5}::GUS$ Pflanzen fungierten als Vergleichspflanzen für die natürliche Auxinverteilung. $P_{CycB1}::GUS$ Pflanzen wurden als Vergleichspflanzen für die im Wildtyp vorhandenen Muster der teilungsaktiven Gewebe verwendet.

Die GUS-Aktivität in den Wurzeln der $P_{DR5}::GUS$ Pflanzen war bei Wachstum auf 500 μ M SO_4^{2-} in den Wurzelspitzen vor Beginn des teilungsaktiven Gewebes lokalisiert (Abb. 7A). Bei Wachstum auf 500 μ M MTA waren in den Wurzelspitzen der $P_{DR5}::GUS$ Pflanzen keine Unterschiede in der GUS-Aktivität im Vergleich zum Wachstum auf 500 μ M SO_4^{2-} zu beobachten (Abb. 7B). Die GUS-Färbung in den Wurzelspitzen der *mtn1-1*/ $P_{DR5}::GUS$ und der *mtn1-2*/ $P_{DR5}::GUS$ Mutanten zeigte keine Unterschiede im Vergleich zu den verwendeten Kontrollen (Abb. 7C-F).

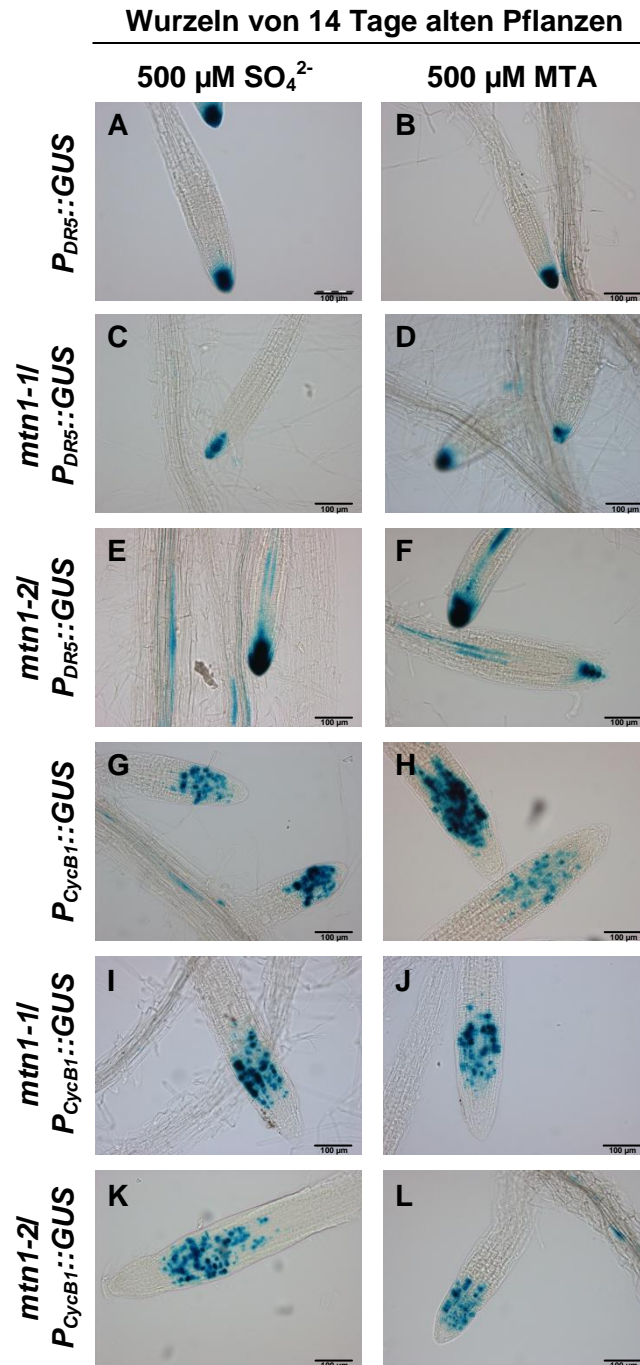


Abbildung 7: Auxinverteilung und Zellteilung in der Wurzel sind unverändert bei Wachstum auf MTA.

Die Pflanzen wurden für 14 Tage auf 0,5 x schwefelreduziertem MS Medium mit 500 $\mu\text{M SO}_4^{2-}$ oder mit 500 $\mu\text{M MTA}$ angezogen. Gezeigt sind repräsentative Wurzeln der Linien *P_{DR5}::GUS*, *mtn1-1/P_{DR5}::GUS*, *mtn1-2/P_{DR5}::GUS*, *P_{CycB1}::GUS*, *mtn1-1/P_{CycB1}::GUS* und *mtn1-2/P_{CycB1}::GUS*. Die Größenbalken repräsentieren 100 μm .

In den Wurzelspitzen der *P_{CycB1}::GUS* Pflanzen war die GUS-Färbung in den Zellen der Teilungszone zu beobachten. Das Wachstum auf 500 µM MTA führte zu keiner Veränderung in der GUS Aktivität, im Vergleich zu dem Wachstum auf 500 µM SO_4^{2-} (Abb. 7G+H). In den Wurzeln der *mtn1-1/P_{CycB1}::GUS* und der *mtn1-2/P_{CycB1}::GUS* Mutanten waren keine Unterschiede in der GUS-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen zu beobachten (Abb. 7I-L).

Regulation des Methioninzyklus durch die Polyaminbiosynthese

Polyamine sind unter anderem, an Prozessen der Zellteilung und der Zelldifferenzierung beteiligt (Galston und Sawhney, 1990; Tabor und Tabor, 1999). Veränderung der Polyamingehalte in den Pflanzen könnte zu dem beobachteten, veränderten Wachstum bei den *mtn1* Mutanten des Methioninzyklus führen und somit eine regulative Verbindung aufzeigen.

Zur Analyse von Regulationen des Methioninzyklus durch die Polyaminbiosynthese wurden Untersuchung mit den Polyaminen Putrescin, Spermidin und Spermin durchgeführt. Dabei ging es vor allem um den Einfluss von Polyaminen während des Wachstums der *mtn1* Mutanten mit besonderem Blick auf das Wurzelwachstum. Dafür wurden die Pflanzen auf verschiedenen Konzentrationen der Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin angezogen. Außerdem wurden die internen Gehalte der freien Polyamine in den Wurzeln der auf 500 μ M MTA angezogenen und den mit Polyaminen behandelten Pflanzen bestimmt. Zusätzlich wurden die Mutanten *spds1*, *spds2-1*, *spds2-2*, *spms*, *acl5*, *samdc1-1*, *samdc1-2*, *samdc2*, *samdc4*, *sdt* und *sct* untersucht, um eventuelle Regulation des Methioninzyklus durch spezifische Schritte in der Synthese der Polyamine zu untersuchen.

Wachstum auf 500 μM MTA steigert den Gehalt von Putrescin, Spermidin und Spermin in den Wurzeln von Arabidopsis

Durch die Analyse der freien Polyamine in 14 Tage alten Wurzeln sollten die Auswirkungen eines gestörten Methioninzyklus auf die Polyaminbiosynthese untersucht werden. Für die Untersuchungen wurden die Gehalte der Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin in den Wurzeln des Wildtyps, der *mtn1-1*, der *mtn1-2*, der *mtn2-1* und der *mtn2-2* Mutanten bestimmt (Abb. 8A-C).

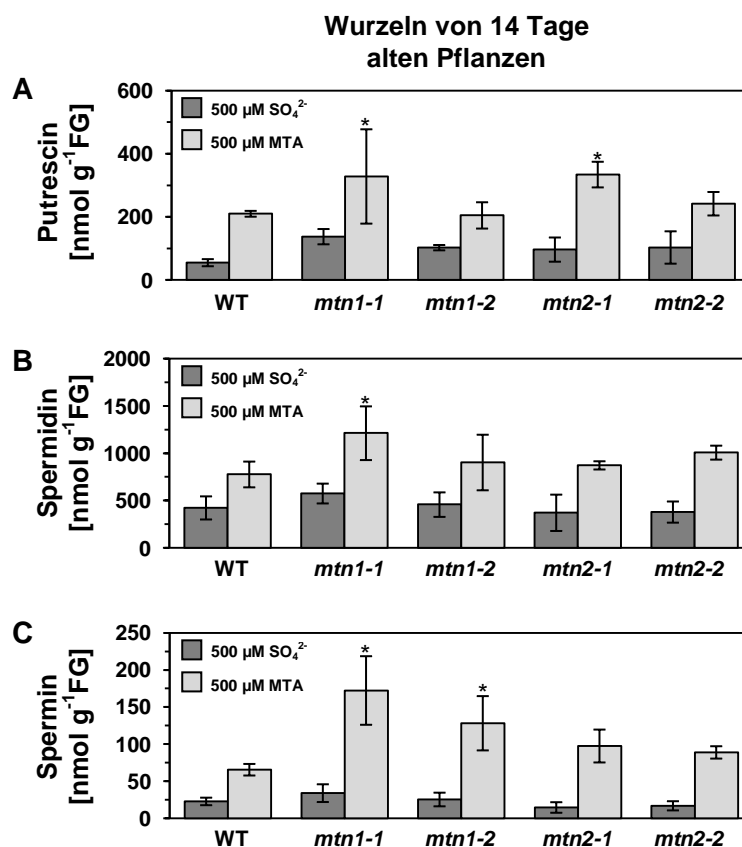


Abbildung 8: Wachstum auf MTA erhöht die Gehalte der Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin.

Messung der freien Form der Polyamine (A) Putrescin, (B) Spermidin und (C) Spermin in Wurzeln von 14 Tage alten Wildtyp (WT), *mtn1-1*, *mtn1-2*, *mtn2-1* und *mtn2-2* Pflanzen. Die Pflanzen wurden auf schwefelreduziertem 0,5 x MS Medium mit 500 $\mu\text{M SO}_4^{2-}$ oder mit 500 $\mu\text{M MTA}$ angezogen. Die Polyamingehalte sind Mittelwerte (\pm Standardabweichung, $p < 0,001$; ANOVA) aus drei biologischen Wiederholungen. Signifikante Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp auf Sulfat sind mit einem (*) gekennzeichnet.

In den Wurzeln der 14 Tage alten Pflanzen war die Konzentration an Spermidin am höchsten (Abb. 8B), gefolgt von dem Gehalt an Putrescin (Abb. 8A) und dem nur in geringer Konzentration vorhandenem Tetraamin Spermin (Abb. 8C). In allen Genotypen war bei Wachstum auf 500 μ M MTA als Schwefelquelle, eine Akkumulation von Putrescin, Spermidin und Spermin zu beobachten. Die Sperminkonzentration wurde durch MTA am stärksten erhöht. Die Akkumulation der Polyamine in den Wurzel bei Wachstum auf 500 μ M MTA war unabhängig vom Genotyp der untersuchten Pflanzen, schien aber im Wildtyp am geringsten zu sein.

Spermin fördert das Wurzelwachstum in den *mtn1* Mutanten signifikant

Der Einfluss der Polyamine auf die Methioninzyklusmutanten *mtn1-1*, *mtn1-2*, *mtn2-1* und *mtn2-2* wurde über Wurzelwachstum untersucht. Hierzu wurden Wildtyp, *mtn1-1*, *mtn1-2*, *mtn2-1* und *mtn2-2* Pflanzen auf schwefelreduziertem Medium mit 500 μ M MTA angezogen und zusätzlich mit 100 und 300 μ M Putrescin oder Spermidin, beziehungsweise mit 100 und 1000 μ M Spermin behandelt (Abb. 9A-J).

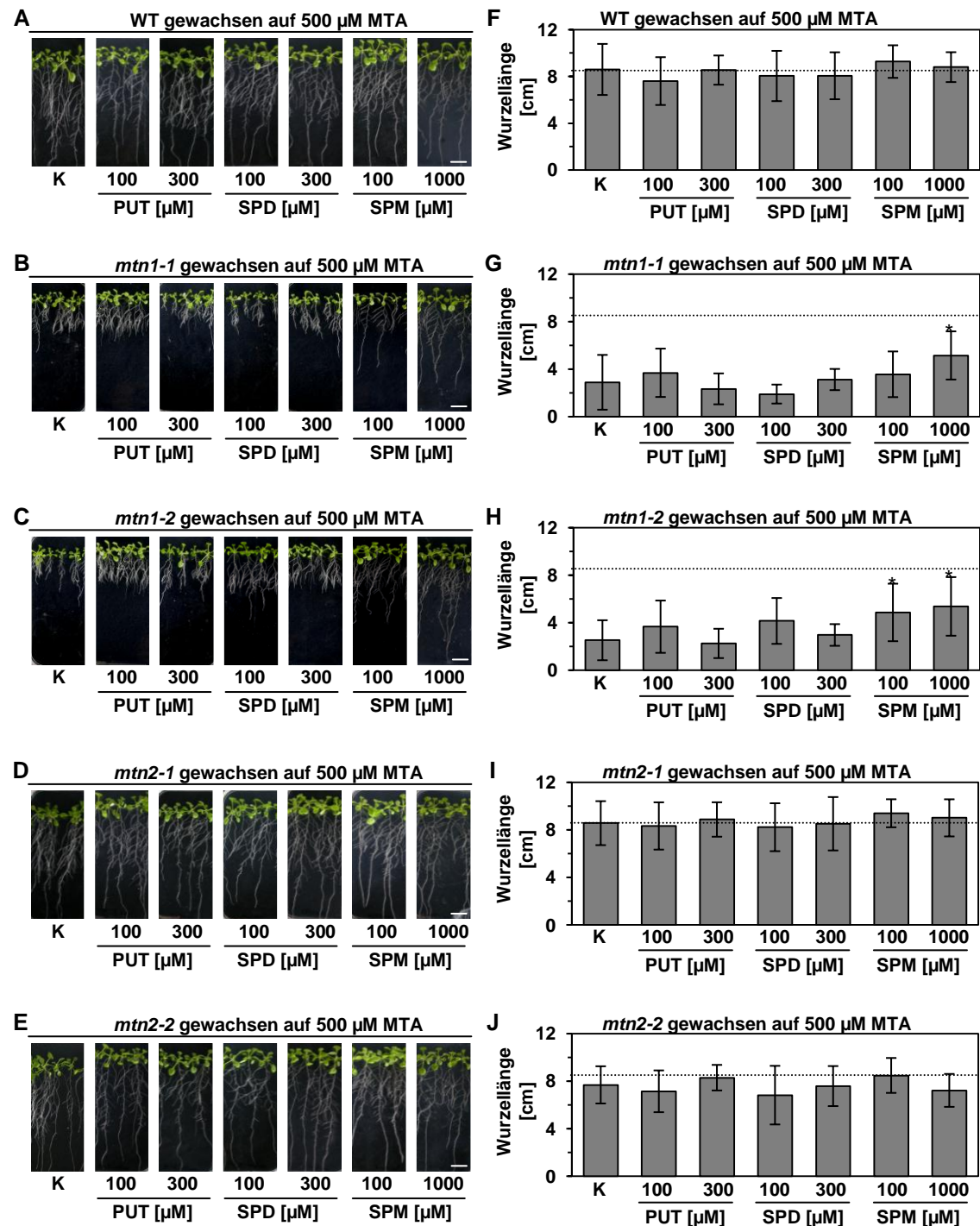


Abbildung 9: Spermin fördert das Wurzelwachstum von *mtn1* Mutanten.

Phänotyp und Wurzellänge von 14 Tage alten (A+F) Wildtyp (WT), (B+G) *mtn1-1*, (C+H) *mtn1-2*, (D+I) *mtn2-1* und (E+J) *mtn2-2* Pflanzen. Die Pflanzen wurden auf schwefelreduziertem 0,5 x MS Medium mit 500 μ M MTA angezogen. Neben den Kontrollen (K) enthielten die Medien 100, 300 oder 1000 μ M der Polyamine Putrescin (PUT), Spermidin (SPD) oder Spermin (SPM). Gezeigt sind repräsentative Pflanzen. Die Längen der Hauptwurzeln (F+G+H+I+J) wurden mit ImageJ gemessen. Die gezeigten Mittelwerte (\pm Standardabweichung, $p < 0,05$, ANOVA) stammen aus drei biologischen Wiederholungen mit je $n = 10$. Signifikante Unterschiede in der Wurzellänge der behandelten Pflanzen, im Vergleich zu ihren Kontrollen sind mit einem (*) markiert. Die Größenbalken in A, B, C, D und E repräsentieren 1 cm.

Die Wurzeln der 14 Tage alten Wildtyppflanzen zeigten keine Unterschiede in ihrer Entwicklung oder der Länge ihrer Hauptwurzeln, bei Zugabe von Putrescin, Spermidin oder Spermin im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 9A+F). Die Behandlung mit 1000 μ M Spermin hatte eine signifikante, wachstumsfördernde Wirkung auf die Länge der Hauptwurzeln in den *mtn1-1* und den *mtn1-2* Mutanten im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (Abb. 9G+H). In den Wurzeln der *mtn1-2* Mutanten war das Wachstum der Hauptwurzel bei einer Zugabe von 300 μ M Spermin signifikant erhöht (Abb. 9H). Die Zugabe von Putrescin oder Spermin in den verwendeten Konzentrationen löste keine signifikante Wachstumsreaktion in den *mtn1-1* und *mtn1-2* Mutanten aus (Abb. 9G+H).

Die Zugabe der Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin in den verwendeten Konzentrationen, führte in den Wurzeln der *mtn2-1* Mutanten (Abb. 9D+I) und in den Wurzeln der *mtn2-2* Mutanten (Abb. 9E+J) zu keiner Wachstumsreaktion im Vergleich zur Kontrolle. Die Wurzeln der *mtn2-1* und *mtn2-2* Mutanten zeigten ein, mit dem Wildtyp vergleichbares, Wurzelwachstum.

Um zu untersuchen, ob eine Zugabe der Polyamine Putrescin, Spermidin oder Spermin einen Einfluss auf die internen Polyamingehalte der Methioninzyklusmutanten hatte, wurden die Gehalte der freien Polyamine Putrescin (Abb. 10A), Spermidin (Abb. 10B) und Spermin (Abb. 10C) gemessen. In den Wurzeln aller verwendeten Genotypen war ein Anstieg des Polyamins zu beobachten, mit dem die Pflanzen behandelt wurden. Der Anstieg im Gehalt von Spermin war im Vergleich zu Putrescin und Spermidin am höchsten, unabhängig von den analysierten Genotypen (Abb. 10C). Unterschiede zwischen den Wurzeln des Wildtyps, der *mtn1-1*, der *mtn1-2*, der *mtn2-1* und der *mtn2-2* Mutanten innerhalb derselben Behandlung waren nicht signifikant.

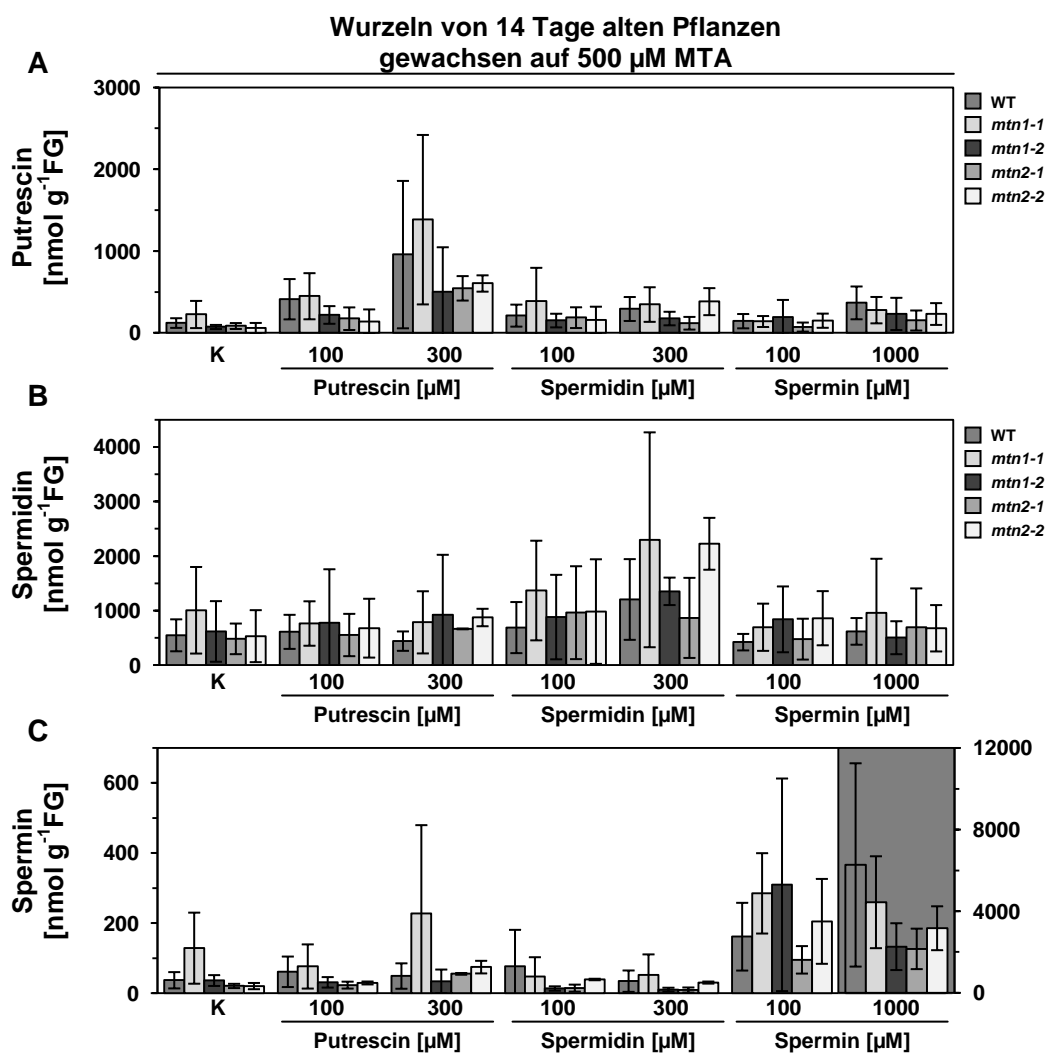


Abbildung 10: Einfluss von Putrescin, Spermidin und Spermin auf die internen Polyamingehalte in den Wurzeln.

Polyamingehalte in 14 Tage alten Wurzeln von Wildtyp (WT), *mtn1-1*, *mtn1-2*, *mtn2-1* und *mtn2-2* Pflanzen. Analysiert wurden (A) Putrescin-, (B) Spermidin- und (C) Spermingehalte nach Behandlung mit 0 (K), 100 oder 300 μM Putrescin und Spermidin oder mit 100 bzw. 1000 μM Spermin. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm Standardabweichung, $p < 0,001$, ANOVA) aus vier biologischen Wiederholungen. Der grau hinterlegte Abschnitt in C und die Beschriftung der Y-Achse rechts davon zeigen die deutlich erhöhten Spermingehalte in den Wurzeln der mit 1000 μM Spermin behandelten Pflanzen.

Veränderungen in der Polyaminbiosynthese führen zu keinem den *mtn1* Mutanten ähnlichen Wurzelphänotyp

Zur Untersuchung der möglichen Regulation der Polyaminbiosynthese durch den Methioninzyklus wurden verschiedene Mutanten der Polyaminbiosynthese analysiert. Der Wildtyp und die Mutanten *spds1*, *spds2-1*, *spds2-2*, *spms*, *acl5*, *samdc1-1*, *samdc1-2*, *samdc2*, *samdc4*, *sdt* und *sct* wurden für vier Tage oder für drei Wochen auf schwefelreduziertem 0,5 x MS Medium angezogen, dem 500 μM Sulfat oder 500 μM MTA hinzugefügt war (Abb. 11+13).

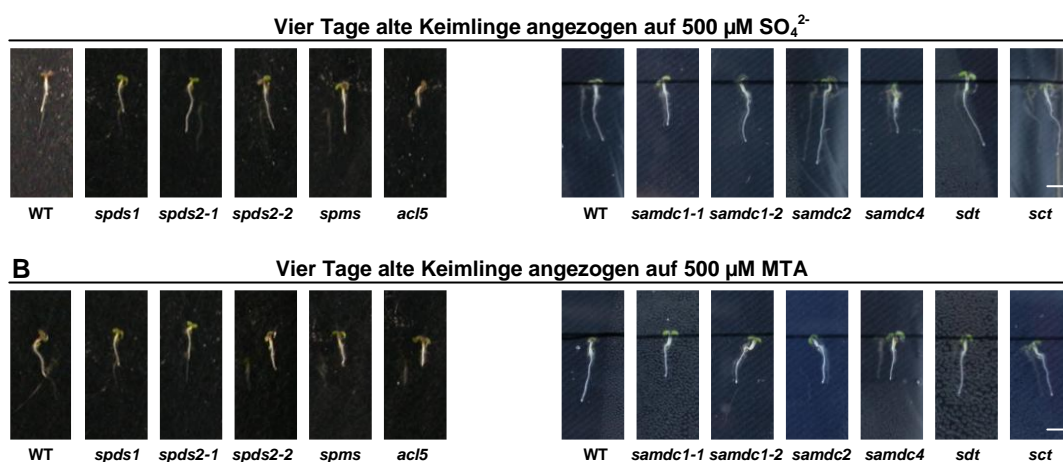


Abbildung 11: Wachstum und Entwicklung von vier Tage alten Mutanten der Polyaminbiosynthesemutanten.

4 Tage alte Wildtyp, *spds1*, *spds2-1*, *spds2-2*, *spms*, *acl5*, *samdc1-1*, *samdc1-2*, *samdc4*, *sdt* und *sct* Keimlinge wurden auf schwefelreduziertem 0,5 x MS Medium angezogen, dem 500 μM SO_4^{2-} (A) oder 500 μM MTA (B) zugesetzt waren. Gezeigt sind repräsentative Keimlinge aus drei biologischen Wiederholungen. Die Größenbalken repräsentieren 200 μm .

Bei Wachstum auf 500 μM MTA zeigten die vier Tage alten Keimlinge des Wildtyps im Vergleich zum Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} keine Unterschiede (Abb. 11A+B). Die Keimlinge der *acl5* Mutante zeigten bei Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} und 500 μM MTA ein reduziertes Wachstum. Im Vergleich zum Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} hatte die Zugabe von 500 μM MTA bei keinem der untersuchten Genotypen eine Auswirkung auf das Wachstum (Abb. 11A+B).

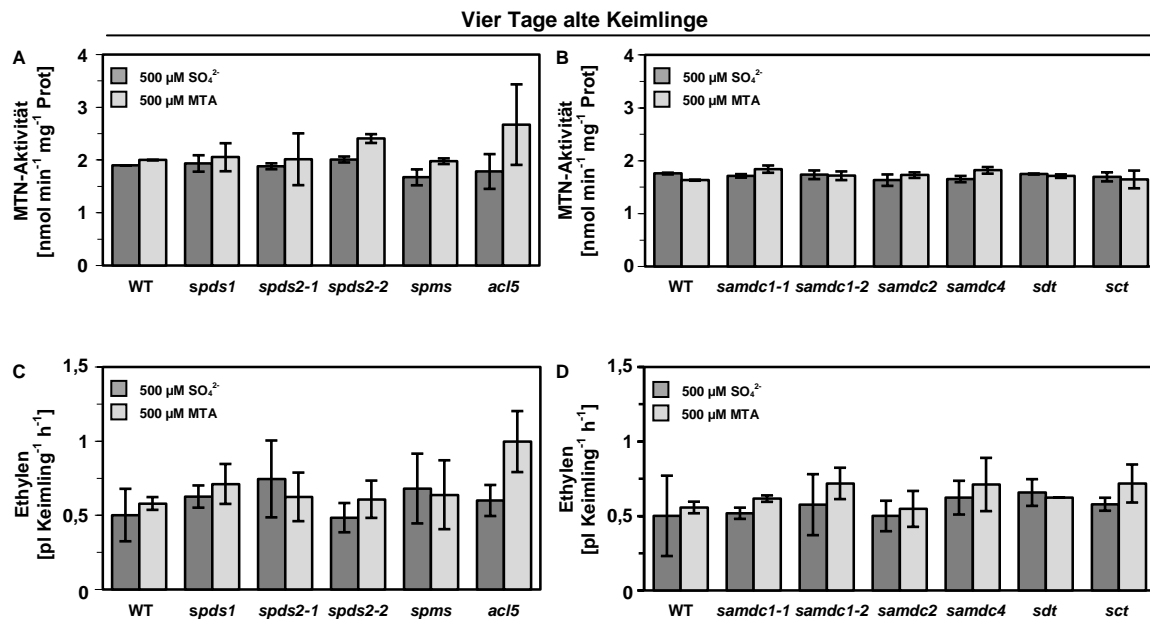


Abbildung 12: MTN-Aktivität und Ethylensynthese sind in vier Tage alten Polyaminbiosynthesemutanten nicht signifikant verändert.

(A+B) MTN-Aktivität und (C+D) Ethylenproduktion von vier Tage alten Keimlingen des Wildtyps (WT) und der Polyaminbiosynthesemutanten *spds1*, *spds2-1*, *spds2-2*, *spms*, *acI5*, *samdc1-1*, *samdc1-2*, *samdc4*, *sdt* und *sct*. Die vier Tage alten Keimlinge wurden auf schwefelreduziertem 0,5 x MS Medium mit (A+C) 500 μM SO₄²⁻ oder (B+D) 500 μM MTA angezogen. Die MTN-Aktivitäten (A+B) sind Mittelwerte (±Standardabweichung, $p < 0,05$, ANOVA) aus drei biologischen Wiederholungen. Die dargestellte Ethylenproduktion (C+D) besteht aus den Mittelwerten (±Standardfehler, $p < 0,001$, ANOVA) von zwei biologischen Wiederholungen mit je $n=3$.

Zusätzlich zur morphologischen Analyse der vier Tage alten Keimlinge von Wildtyp und Polyaminbiosynthesemutanten wurden die MTN-Aktivität und die Ethylenproduktion in den Keimlingen untersucht (Abb. 12A-D). Keimlinge des Wildtyps zeigten keine Veränderung in der MTN-Aktivität bei Wachstum auf 500 μM MTA im Vergleich zum Wachstum auf 500 μM SO₄²⁻ (Abb. 12A+B). Im Vergleich zum Wildtyp zeigte keiner der untersuchten Genotypen eine signifikante Veränderung in der MTN-Aktivität unabhängig davon, ob die Keimlinge auf 500 μM SO₄²⁻ oder auf 500 μM MTA als Schwefelquelle angezogen wurden (Abb. 12A+B). In Keimlingen der *acI5* Mutante war eine erhöhte MTN-Aktivität bei Wachstum auf 500 μM MTA zu beobachten, diese war jedoch nicht signifikant (Abb. 12A).

Die Ethylenproduktion in den Keimlingen des Wildtyps war bei Wachstum auf 500 μM MTA im Vergleich zum Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} nicht verändert (Abb. 12C+D). Die untersuchten Genotypen zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Ethylenproduktion im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 12C+D). Die Erhöhung der Ethylenproduktion in den Keimlingen der *acI5* Mutanten bei Wachstum auf 500 μM MTA im Vergleich zum Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} war, wie die Steigerung der MTN-Aktivität, nicht signifikant (Abb. 12C).

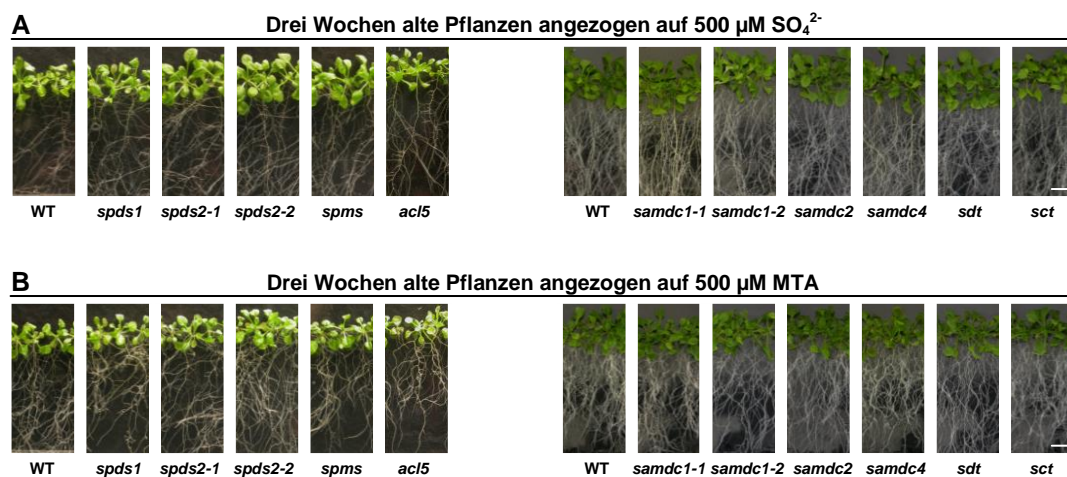


Abbildung 13: Drei Wochen alte Polyaminbiosynthesemutanten zeigen keinen sichtbaren Phänotyp.

(A+B) drei Wochen alte Wildtyp, *spds1*, *spds2-1*, *spds2-2*, *spms*, *acI5*, *samdc1-1*, *samdc1-2*, *samdc4*, *sdt* und *sct* Pflanzen. Die Pflanzen wurden für drei Wochen auf schwefelreduziertem 0,5 x MS Medium angezogen dem 500 μM SO_4^{2-} (A) oder 500 μM MTA (B) zugesetzt waren. Gezeigt sind repräsentative Pflanzen aus drei biologischen Wiederholungen. Die Größenbalken repräsentieren 1 cm.

Bei Wachstum auf 500 μM MTA zeigten die drei Wochen alten Pflanzen des Wildtyps eine geringe Reduktion des Sprosswachstums, im Vergleich zum Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} (Abb. 13A+B). Die drei Wochen alten Pflanzen der *acI5* Mutanten zeigten auf 500 μM Sulfat, im Vergleich zum Wildtyp ein geringeres Spross- und Wurzelwachstum (Abb. 13A). Die Pflanzen der *spds1*, *spds2-1*, *spds2-2*, *spms*, *samdc1-1*, *samdc1-2*, *samdc2*, *samdc4*, *sdt* und *sct* Mutanten zeigten keine Unterschiede im Wachstum im Vergleich zum Wildtyp.

Beim Wachstum der drei Wochen alten Pflanzen auf 500 μM MTA, im Vergleich zum Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} , war in allen Genotypen eine geringe Reduktion des Sprosswachstums, zu beobachten (Abb. 13A+B). Die Wurzeln der *ac15* Mutante auf 500 μM MTA zeigten, im Vergleich zum Wildtyp auf 500 μM MTA, ein reduziertes Wachstum (Abb. 13B).

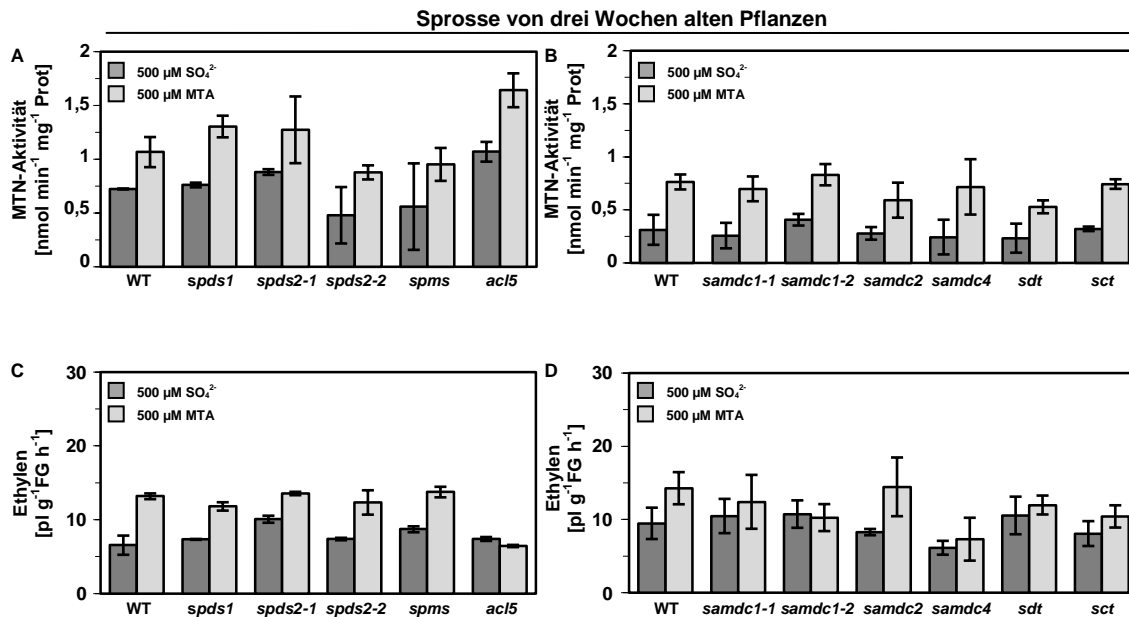


Abbildung 14: MTN-Aktivität und Ethylensynthese aus Sprossen von drei Wochen alten Polyaminbiosynthesemutanten.

(A+B) MTN-Aktivität und (C+D) Ethylenproduktion in Sprossen von drei Wochen alten Pflanzen des Wildtyps (WT) und der Polyaminbiosynthesemutanten *spds1*, *spds2-1*, *spds2-2*, *spms*, *ac15*, *samdc1-1*, *samdc1-2*, *samdc4*, *sdt* und *sct*. Die drei Wochen alten Pflanzen wurden auf schwefelreduziertem 0,5 x MS Medium mit (A+C) 500 μM SO_4^{2-} oder (B+D) 500 μM MTA angezogen. Die (A+B) MTN-Aktivitäten sind Mittelwerte (\pm Standardabweichung, $p < 0,05$, ANOVA) aus drei biologischen Wiederholungen. Die dargestellte (C+D) Ethylenproduktion besteht aus den Mittelwerten (\pm Standardabweichung, $p < 0,05$, ANOVA) von drei biologischen Wiederholungen.

Zusätzlich zu den morphologischen Untersuchungen der drei Wochen alten Pflanzen wurden die MTN-Aktivität und die Ethylenproduktion der Sprosse bestimmt (Abb. 14A-D). Bei der Untersuchung der MTN-Aktivitäten konnte in den Sprossen aller analysierten Genotypen ein Anstieg der MTN-Aktivität bei Wachstum auf 500 μM MTA im Gegensatz zum Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} beobachtet werden.

Die MTN-Aktivitäten der untersuchten Polyaminmutanten zeigten bei Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} oder 500 μM MTA, keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu ihren jeweiligen Wildtypkontrollen (Abb. 14A+B).

Die untersuchten Genotypen zeigten im Vergleich zum Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} mit Ausnahme der *acl5*, der *samdc1-2* und der *samdc4* Mutanten einen Anstieg der Ethylenproduktion bei Wachstum auf 500 μM MTA (Abb. 14C+D). Sprosse der analysierten Mutanten, die auf 500 μM SO_4^{2-} angezogen wurden zeigten, im Vergleich zum Wildtyp keine signifikanten Unterschiede in der Ethylenproduktion (Abb. 14C+D).

Cyclohexylamin führt zu keiner sichtbaren Veränderung des Wachstums von Spermidinsynthesemutanten

Cyclohexylamin (CHA) ist ein Inhibitor der Spermidin Synthase (SPDS) in Säugetierzellen und Tabak (Hibasami et al., 1980; Kaur-Sawhney et al., 1988). Der Einfluss einer reduzierten SPDS-Aktivität auf das Wachstum von *Arabidopsis thaliana* sollte untersucht werden. Dazu wurden Wildtyp, *spds1-1* und *spds2-1* Pflanzen auf 0,5 x MS Medium mit 0 (K), 10, 100 oder 1000 μ M Cyclohexylamin angezogen. 14 Tage alte Wildtyppflanzen zeigten keine sichtbaren Unterschiede in Spross- oder Wurzelwachstum bei Behandlung mit CHA (Abb. 15A). Die Pflanzen der *spds1-1* und der *spds2-1* Mutanten zeigten keinen sichtbaren Unterschied bei Behandlung mit 10, 100 oder 1000 μ M CHA im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 15B+C).

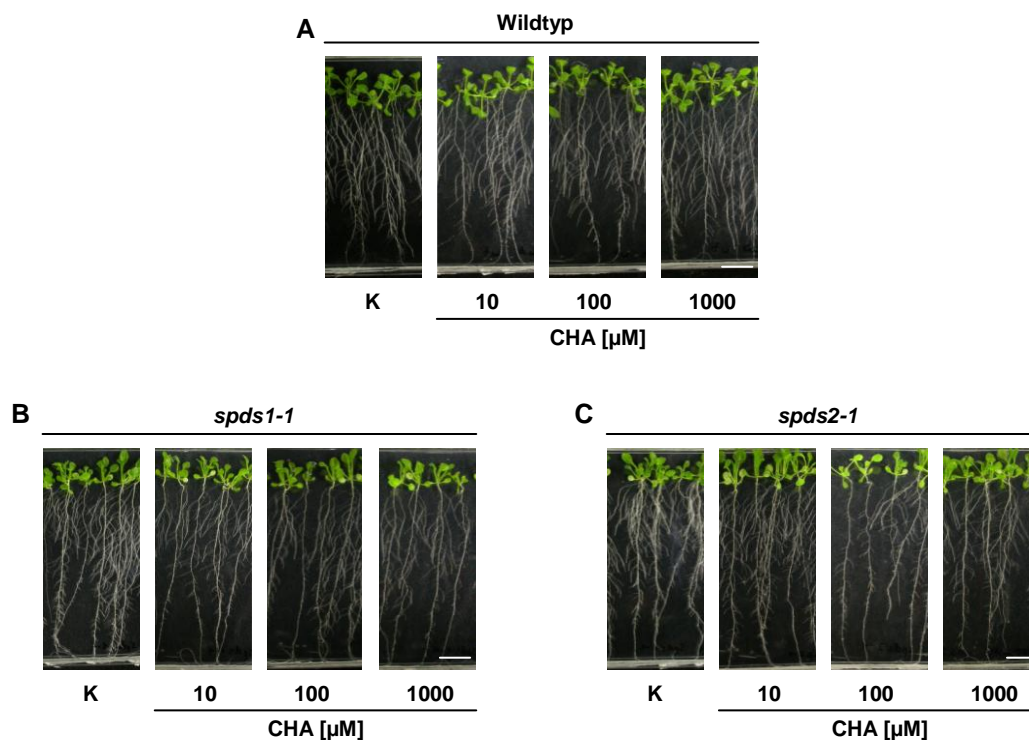


Abbildung 15: Behandlung mit Cyclohexylamin führt zu keiner Veränderung in Wachstum und Entwicklung bei Wildtyp, *spds1-1* und *spds2-1* Pflanzen.

Pflanzen des (A) Wildtyps, (B) der *spds1-1* und (C) der *spds2-1* Mutanten wurden für 14 Tage auf 0,5 x MS Medium mit 0 (K), 10, 100 und 1000 μ M Cyclohexylamin (CHA) angezogen. Gezeigt sind repräsentative Pflanzen aus drei biologischen Wiederholungen. Die Größenbalken repräsentieren 1 cm.

Regulation der MTN durch die Ethylenantwort

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von Ethylen auf die Methylthioadenosin-Nukleosidase (MTN) untersucht, um eventuelle Regulationen zwischen Ethylenbiosynthese/-signalweg und dem Methioninzyklus zu analysieren. Dazu wurde zum Einen die Aktivität der MTN bei Zugabe von Ethylen betrachtet. Zum Anderen wurden über qPCRs Untersuchungen zur Transkriptmenge von *MTN1* und *MTN2* bei Ethylenzugabe durchgeführt und *MTN1* auf Proteinebene analysiert. Mit Hilfe des Translationsinhibitors CHX und des Proteasomeninhibitors MG132 wurden Untersuchungen zur Translationseffizienz und zum Proteinabbau durchgeführt. Zusätzlich wurden die Methioninzyklusaktivitäten der Ethylenmutanten *ein2*, *eto3* und *crt1* untersucht und der Einfluss von 1-MCP, eines Inhibitors der Ethylenantwort, auf die Ethylenmutanten und den Wildtyp analysiert.

Inhibition der MTN-Aktivität durch Ethylen

Zur Untersuchung der Auswirkungen einer erhöhten Ethylenproduktion und eines dauerhaft induzierten Ethylensignals, ohne die damit normalerweise verbundene, erhöhte Produktion von MTA, wurden ACC und Ethylen verwendet. Der Einfluss auf die MTN-Aktivität wurde in Wurzeln von 14 Tage alten Wildtyp, *mtn1-1*, *mtn1-2*, *mtn2-1*, *mtn2-2* und *mtk* Pflanzen, die auf 0,5 x MS Medium oder 0,5 x MS Medium mit 10 µM ACC angezogen wurden, untersucht (Abb. 16A). Zusätzlich wurden Wildtyppflanzen auf 0,5 x MS Medium oder 0,5 x MS Medium mit 1 ppm Ethylen angezogen. Die Wurzeln dieser Pflanzen wurden zur Bestimmung der MTN-Aktivität verwendet (Abb. 16B).

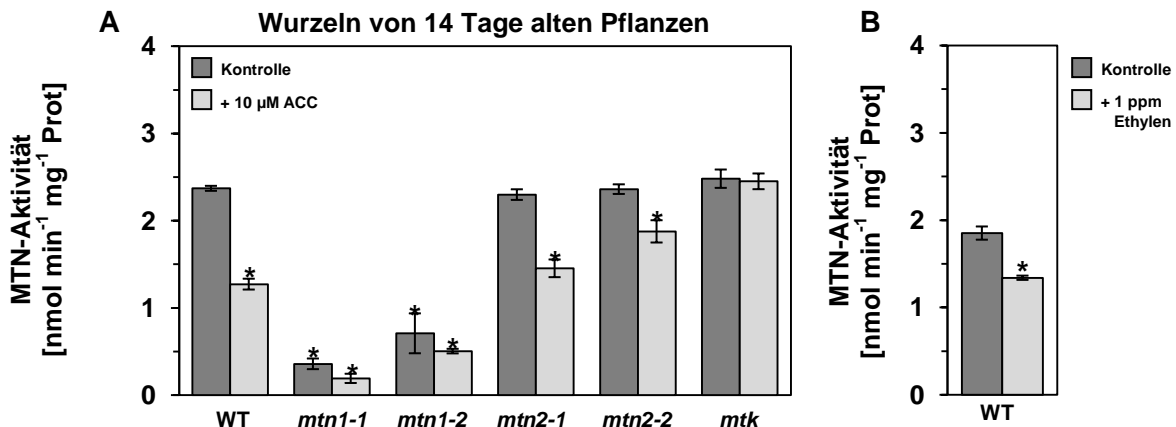


Abbildung 16: ACC und Ethylen reduzieren die MTN-Aktivität in der Wurzel. MTN-Aktivität in Wurzeln von 14 Tage alten Wildtyp (WT), *mtn1-1*, *mtn1-2*, *mtn2-1*, *mtn2-2* und *mtk* Pflanzen. Die Pflanzen wurden auf 0,5 x MS Medium oder 0,5 x MS Medium mit 10 µM ACC angezogen. Zusätzlich wurden Pflanzen auf 0,5 x MS Medium angezogen und mit 1 ppm Ethylen begast. Die MTN-Aktivitäten sind (A) Mittelwerte (\pm Standardfehler, $p < 0,001$, ANOVA) aus zwei biologischen Wiederholungen mit je $n=3$ oder (B) Mittelwerte (\pm Standardfehler, $p < 0,001$, ANOVA) aus zwei biologischen Wiederholungen mit je $n=6$. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle des Wildtyps sind mit (*) markiert.

In den Wurzeln des Wildtyps (WT) führte die Zugabe von 10 µM ACC zu einer signifikanten Reduktion der MTN-Aktivität von 40% (Abb. 16A) im Vergleich zur Kontrolle. Durch das Begasen mit 1 ppm Ethylen kam es zu einer signifikanten Reduktion der MTN-Aktivität in den Wurzeln um 30%, im Vergleich zu der MTN-Aktivität aus unbehandelten Wildtyppflanzen (Abb. 16B). Die *mtn1-1* und die *mtn1-2* Mutanten hatten auf Vollmedium eine um bis zu 80%, verringerte MTN-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle des Wildtyps. Die beobachtete Reduktion der MTN-Aktivität in Wurzeln der *mtn1-1* und *mtn1-2* Mutanten bei Wachstum auf 10 µM ACC war nicht signifikant im Vergleich zum Wachstum ohne ACC Behandlung (Abb. 16A). In den Wurzeln der *mtn2-1* und der *mtn2-2* Mutanten war bei Wachstum auf 10 µM ACC eine Reduktion der MTN-Aktivität von jeweils 36% und 20%, im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen, zu sehen. Die MTN-Aktivität in den Wurzeln der *mtk* Mutanten zeigte keine Unterschiede bei Zugabe von 10 µM ACC im Vergleich zu der MTN-Aktivität in Wurzeln von nicht behandelten Pflanzen (Abb. 16A).

In weiteren Analysen sollte untersucht werden, in welchem Zeitrahmen nach Start der Behandlung die Reduktion der MTN-Aktivität durch Ethylen einsetzt. Dazu wurden 14 Tage alte Arabidopsis Pflanzen für 30 Minuten, eine, zwei, vier und acht Stunden mit 1 ppm Ethylen begast. Als Kontrolle wurden nicht behandelte Pflanzen verwendet (Abb. 17).

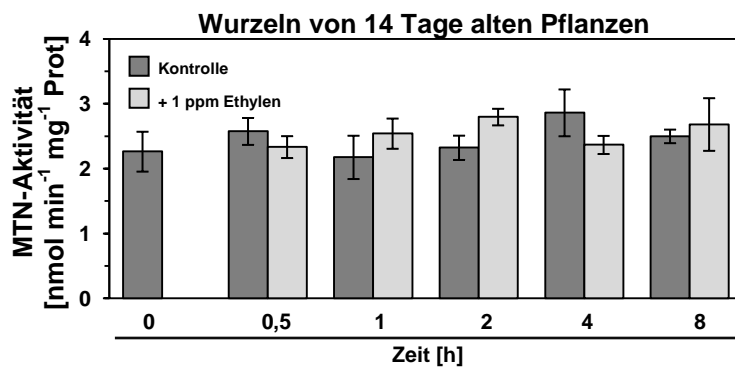


Abbildung 17: Acht Stunden Ethylenbehandlung führen zu keiner signifikanten Reduktion der MTN-Aktivität.

MTN-Aktivität in den Wurzeln von 14 Tage alten Wildtyp Pflanzen. Die Pflanzen wurden auf 0,5 x MS Medium angezogen. Zusätzlich wurden einige Pflanzen für 30 Minuten, eine, zwei, vier oder acht Stunden [h] 1 ppm Ethylen behandelt. Die dargestellten MTN-Aktivitäten sind Mittelwerte (\pm Standardfehler, $p < 0,001$, ANOVA) aus vier biologischen Wiederholungen pro Zeitpunkt mit je $n=3$.

Die Behandlung der 14 Tage alten Pflanzen mit 1 ppm Ethylen für 30 Minuten, eine, zwei, vier oder acht Stunden, führte zu keiner signifikanten Reduktion der MTN-Aktivität in den Wurzeln, im Vergleich zu der MTN-Aktivität in Wurzeln der unbehandelten Pflanzen (Abb. 17).

Zusätzlich zu den Untersuchungen mit Ethylen wurden Pflanzen für ein, zwei und drei Tage mit 10 μ M ACC behandelt. Durch die vorherigen Analysen wurde gezeigt, dass Behandlung mit 10 μ M ACC ebenso einen Effekt auf die MTN-Aktivität in Wurzeln hatte, wie die Behandlung mit 1 ppm Ethylen (Abb. 16A+B). Die Behandlung der Pflanzen mit ACC fand durch Umsetzen der Pflanzen auf Medium mit 10 μ M ACC statt (Abb. 18).

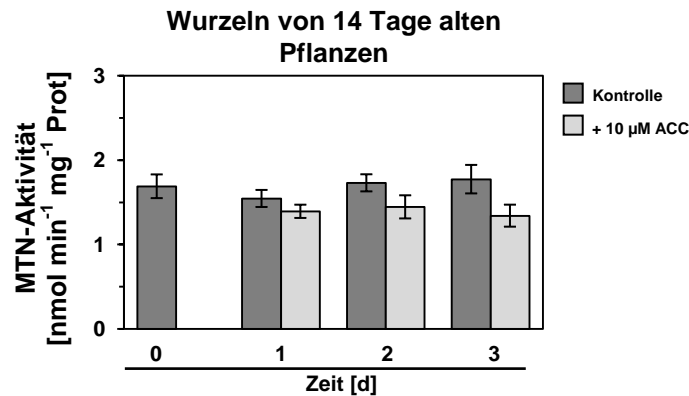


Abbildung 18: Behandlung mit ACC führt nach drei Tagen zu keiner signifikanten Reduktion der MTN-Aktivität.

MTN-Aktivität in den Wurzeln von 14 Tage alten Wildtyp Pflanzen. Die Pflanzen wurden auf 0,5 x MS Medium angezogen. Zusätzlich wurden einige Pflanzen für ein, zwei oder drei Tage [d] mit 10 µM ACC behandelt. Die dargestellten MTN-Aktivitäten sind Mittelwerte (\pm Standardfehler, $p < 0,001$, ANOVA) aus zwei biologischen Wiederholungen pro Zeitpunkt mit je $n=3$.

Die Wurzeln der mit 10 µM ACC behandelten Wildtyppflanzen zeigten nach einem Tag Behandlung keine signifikante Reduktion der MTN-Aktivität, im Vergleich zu den Wurzeln der nicht behandelten Pflanzen. Auch nach zwei und drei Tagen Behandlung mit 10 µM ACC war die MTN-Aktivität in den Wurzeln der behandelten Pflanzen im Vergleich zu den unbehandelten Pflanzen nicht signifikant reduziert (Abb. 18).

MTN-Promotorbereiche enthalten keine Motive für Ethylen-abhängige Transkriptionsfaktoren

Zur Analyse der Regulation der *MTN* Transkription durch die eventuelle Bindung Ethylen-abhängiger Transkriptionsfaktoren im Promotorbereich wurden die Promotoren von *MTN1* und *MTN2* über PlantPAN untersucht. In Tabelle 5 sind die verschiedenen Transkriptionsfaktorbindestellen von *MTN1* und *MTN2* aufgelistet. Einige Bindestellen waren mehrmals vorhanden (nicht gezeigt). Elemente zur Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren, die sowohl im Promotor von *MTN1* als auch im Promotor von *MTN2* vorhanden waren sind grau unterlegt). Die Motive, die nur in einem der beiden untersuchten Promotoren zu finden waren sind weiß hinterlegt (Tabelle 5). In

keinem der beiden Promotoren ließen sich Elemente zur Bindung von Ethylen-abhängigen Transkriptionsfaktoren finden.

Tabelle 5: Transkriptionsfaktorbindestellen in den Promotoren von *MTN1* und *MTN2*.

Zur Analyse wurden die für *MTN1* und *MTN2* annotierten Promotorbereiche (www.arabidopsis.org) aufwärts des ATG bis zum Ende des vorherigen Gens verwendet. Zusätzlich sind die jeweiligen Sequenzen zur Bindung der Transkriptionsfaktoren angegeben. Motive für die Bindung von Transkriptionsfaktoren, die sowohl im Promotor von *MTN1* als auch im Promotor von *MTN2* vorhanden waren sind grau hinterlegt.

<i>MTN1</i>		<i>MTN2</i>	
Faktor	Bindesequenz	Faktor	Bindesequenz
AGL3	caaatgttaTATGGtttt	AGL3	agacgctgcTATGGaagg
AG	acccCCAAAagtttaga	ANT	atTCGGGtcggatc
Athb-1	aaaaATAATtgtt	Athb-1	tattaATTATgcta
ATHB-5	gAATAAgca	ATHB-5	aAATAAcga
ATHB-9	tacgtttATGATgctgaa	PIF3	cttgcttACGTGgcataa
RAV1	cagCAACAaatg	ABRE-like	TACGTGGC
ACGTATERD1	ACGT	ABREATCONSENSUS	TACGTGGC
ANAERO1CONSENSUS	TTTGTTT	ABRELATERD1	ACGTG
ANAERO2CONSENSUS	AGCAGC	ABRE	TACGTGGC
AP1	CCAAAAA	ACGTABREMOTIFA2OSEM	ACGTGGC
ARR10	AGATTAGT	ACGTATERD1	ACGT
ARR1AT	TGATT	ANAERO1CONSENSUS	TTTGTTT
ASF1MOTIFCAMV	CGTCA	ANAERO2CONSENSUS	GCTGCT
Bellringer	TTTAATTT	ARR1AT	GGATT
Core	TAAT	ASF1MOTIFCAMV	CGTCA
E2FCONSENSUS	ATTCGCCG	Agamous	TCTTCTAATGG
GATABOX	TATC	Core	ATTA
GBF5	ACTCAT	E2FCONSENSUS	GGGGGAAA
GT1CONSENSUS	TTTTTC	GATABOX	GATA
IBOX	GATAAG	GT1CONSENSUS	TTTTCC
MYB1AT	TGGTTT	HEXAMERATH4	CGACGG
MYBCOREATCYCB1	CCGTT	LTRECOREATCOR15	GTCGG
MYCCONSENSUSAT	CAGATG	MYBCOREATCYCB1	AACGG
POLASIG1	AATAAA	POLASIG1	TTTATT
PREATPRODH	ACTCAT	SITEIIATCYTC	TGGGCC
RAV1-A	TGTTG	SORLIP1AT	GTGGC
RAV1AAT	TGTTG	SORLIP2AT	GGGCC
SREATMSD	GGATAA	SREATMSD	GGATAA
SURECOREATSULTR11	GAGAC	SV40COREENHAN	GTGGATAG
WBOXATNPR1	TTGAC	UP1ATMSD	TATTGGGCC
		WBOXATNPR1	GTCAA

Die Reduktion der MTN-Aktivität beruht nicht auf geringeren *MTN* Transkriptmengen

Die qPCR wurde genutzt, um die Regulation der MTN auf Transkriptebene zu untersuchen. Dazu wurden die relativen Transkriptmengen von *MTN1* und *MTN2* aus Wurzeln von 14 Tage alten Pflanzen verglichen, die auf 0,5 x MS oder auf 0,5x MS mit 10 μ M ACC angezogen wurden (Abb. 19).

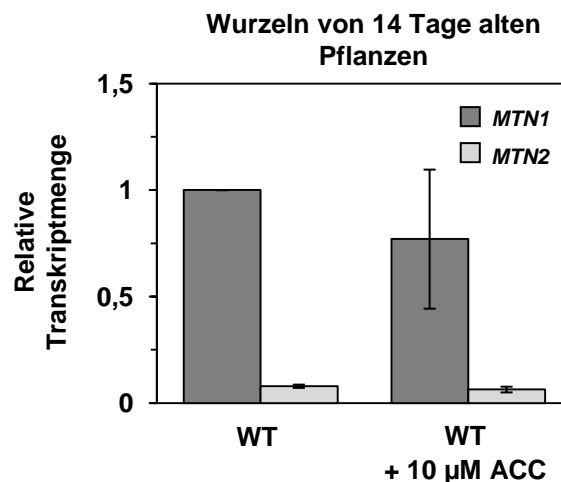


Abbildung 19: *MTN1* und *MTN2* Transkriptmengen sind nicht reguliert nach Behandlung mit ACC.

Die Wildtyppflanzen (WT) wurden für 14 Tage auf 0,5 x MS Medium und 0,5 x MS Medium mit 10 μ M ACC angezogen, 1 μ g der isolierten RNA aus den Wurzeln wurde über RT-PCR in cDNA umgeschrieben und für die qPCR verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) aus drei biologischen Wiederholungen.

Bei Wachstum auf MS Medium mit 10 μ M ACC waren im Vergleich zum Wachstum auf MS Medium ohne ACC in der Transkriptmenge von *MTN1* und *MTN2* keine signifikanten Unterschiede zu beobachten. Die relative Transkriptmenge von *MTN1* in Wurzeln von 14 Tage alten Pflanzen bei Anzucht auf 10 μ M ACC lag im Durchschnitt bei 0,79 (\pm 0,23) im Vergleich zu den Wurzeln von unbehandelten Pflanzen. Der Mittelwert der relativen *MTN2* Transkriptmenge aus Wurzeln von behandelten Pflanzen betrug 0,81 (\pm 0,16) im Vergleich zu der Transkriptmenge aus Wurzeln von unbehandelten Pflanzen (Abb. 19). Die Transkriptmenge von *MTN2* betrug unabhängig von der Behandlung mit ACC etwa 8 % der Transkriptmenge von *MTN1*.

ACC Behandlung führt zu geringeren MTN1 Proteinmengen

Zur Untersuchung der MTN1 Proteinmengen wurden Proteinextrakte aus den Wurzeln von 14 Tage alten Pflanzen verwendet, welche auf 0,5 x MS Medium oder 0,5 x MS Medium mit 10 μ M ACC angezogen wurden. Zusätzlich wurden die Wurzeln von Pflanzen analysiert, welche auf 0,5 x MS Medium angezogen und mit 1 ppm Ethylen behandelt wurden (Abb. 20A). Zur Kontrolle der Beladung wurde die zur Detektion verwendete Membran mit Coomassie gefärbt (Abb. 20B).

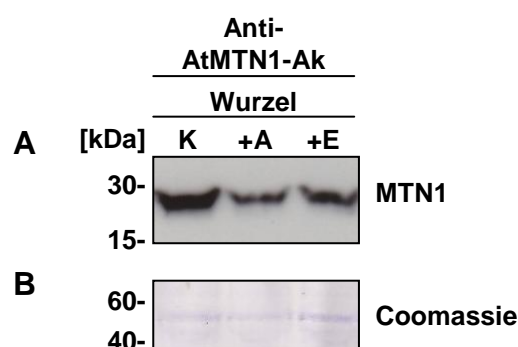


Abbildung 20: Behandlung mit ACC und Ethylen führt zur Reduktion der MTN1 Proteinmenge.

Nachweis von MTN1 in verschiedenen Proteinextrakten von 14 Tage alten Arabidopsiswurzeln über Westernblot. Die Pflanzen wurden für 14 Tage auf 0,5 x MS Medium (K), 0,5 x MS Medium mit 10 μ M ACC (+A) oder 0,5 x MS Medium und 1 ppm Ethylen (+E) angezogen. (A) Gezeigt ist ein repräsentativer Blot. Zur Kontrolle der Ergebnisse wurden zwei weitere Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt (siehe Anhang 1). (B) Als Beladungskontrolle wurde die verwendete Membran mit Coomassie gefärbt.

Alle Taschen des SDS-Gels waren gleichmäßig beladen (Abb. 20B), so konnten die MTN1 Banden auf dem Westernblot direkt miteinander verglichen werden. In den Wurzeln der unbehandelten Wildtyppflanzen waren größere Mengen MTN1 Protein zu detektieren als in den Wurzeln der mit 10 μ M ACC oder 1 ppm Ethylen behandelten Pflanzen. In den Wurzeln der mit 10 μ M ACC behandelten Pflanzen war die geringste Menge an MTN1 zu detektieren (Abb. 20A).

Proteinmengen können über den Proteinabbau reguliert werden. Der Abbau von Proteinen über den Ubiquitin-Proteasomenweg spielt hierbei eine wesentliche Rolle (Vierstra, 2009). Für diese Art des Proteinabbaus müssen die Proteine durch Ubiquitinierung markiert werden.

Für MTN1 und MTN2 wurden die Primärsequenzen auf potentielle Ubiquitinierungsstellen untersucht. Der Proteinabbau über Ubiquitinierung und anschließende Degradation des Proteins im 26S Proteasom ist die häufigste Methode Proteine über ihren Abbau zu regulieren. Für die Vorhersage potentieller Ubiquitinierungsstellen wurden die Programme CKSAAP und UbPred verwendet (Abb. 21).

```

MTN1:
001 MAPHGDGLSD IEEPEVDAQS EILRPISVV FVIAMQAEAL PLVNKFGlse
051 TTDSPGLGKL PWVLYHGVHK DLRINVVCPG RDAALGIDSV GTVPASLITF
101 ASIQALKPDI IINAGTCGGF KVKGANIGDV FLVSDVVFHD RRIPIPMFDL
151 YGVGLRQAFS TPNLLKELNL KIGRLSTGDS LDMSTQDETL IIANDATLKD
201 MEGAAYVA DLLKIPVVFL KAVTDLVDGD KPTAEFLQN LTVVTAALeg
351 TATKVINFIN GRNLSDL
-----
MTN2:
001 MEGVMGQVEK RPISTIVFIV AMQKEAQPLI NRLRLVEEVN TPFPKEVTWI
051 MFKGMYKDLN INIVCPGKDS TLGVESVGTV PASLVTYASI LAIQPDLIIN
101 AGTAGGFKAK GACISDVYVV STVAFHRRRI PVPVLDIYGV GMRNTFPTPN
151 LIKELNLLKVG RLSTGDSMDM SPHDEESITA NDATVKDMEG AAVAYVADIE
201 KVPTILIKGV TDIVDGNRPT SEEFLENLAA VTAKLDESLT KVIDFISGKC
251 LSDL
-----

```

Abbildung 21: Potentielle Ubiquitinierungsstellen und SUMOylierungsstellen in den Primärsequenzen von MTN1 und MTN2.

Die Primärsequenzen der Proteine MTN1 und MTN2 im Ein-Buchstaben-Aminosäurenkode. Die Lysinreste, die potentiell ubiquitiniert werden könnten, sind in der Primärsequenz schwarz unterlegt. Die potentiellen SUMOylierungsstellen sind grau unterlegt.

Für MTN1 konnte keine, von beiden benutzten Programmen vorhergesagte, Ubiquitinierungsstelle gefunden werden. Das Programm CKSAAP annotierte für MTN1 an Position 199 (Score: 0,113) mit niedriger Wahrscheinlichkeit (Score: 0,052 - 0,130) eine Ubiquitinierungsstelle. Das Programm UbPred sagte an Position 199 keine Ubiquitinierungsstelle vorher. Laut dem Programm UbPred befindet sich mit mittlerer Wahrscheinlichkeit (Score: 0,69 – 0,84) an Position 231 (Score: 0,70) der MTN1 Primärsequenz

eine Ubiquitinierungsstelle. Das Programm CKSAAP sagte an Position 231 keine Ubiquitinierungsstelle vorher (Abb. 21).

Für MTN2 konnte ebenfalls keine Ubiquitinierungsstelle gefunden werden, die von beiden benutzten Programmen erkannt wurde. Das Programm CKSAAP annotierte an Position 186 (Score: 0,142) mit hoher Wahrscheinlichkeit (Score: > 0,130) eine Ubiquitinierungsstelle. Diese Ubiquitinierungsstelle konnte nicht von dem Programm UbPred bestätigt werden. Das Programm UbPred konnte in der Primärsequenz von MTN2 keine Ubiquitinierungsstelle feststellen (Abb. 21).

Eine weitere Möglichkeit der Proteinregulation ist die SUMOylierung. Dabei werden über einen der Ubiquitinierung ähnlichen Prozess sogenannte SUMO-Proteine an das zu regulierende Protein gebunden (Hay, 2005). Für die Analysen der MTN1 und MTN2 Primärsequenzen auf potentielle SUMOylierungsstellen wurden die Programme SUMOplot und SUMOFI verwendet (Abb. 21).

Das Programm SUMOplot sagte für MTN1 an Position 107, 171 und 214 potentielle SUMOylierungsstellen (Score: 0,91; 0,73 und 0,80) vorher (Abb. 21). Diese SUMOylierungsstellen konnten nicht durch das Programm SUMOFI bestätigt werden. In der Primärsequenz von MTN2 konnte SUMOplot an Position 10, 158, 201 und 243 potentielle SUMOylierungsstellen (Score: 0,39; 0,73; 0,74 und 0,79) finden (Abb. 21). SUMOFI sagte in der Primärsequenz von MTN2 keine SUMOylierungsstellen vorher.

Zusätzlich zu der Untersuchung der Primärsequenzen auf potentielle Ubiquitinierungsstellen und SUMOylierungsstellen wurden Versuche mit Cycloheximid (CHX) durchgeführt. CHX hemmt die Translation in eukaryotischen Organismen (Steel und Jacobson, 1987). Geschwindigkeit und Effizienz des Proteinabbaus können so untersucht werden. 14 Tage alte, auf 0,5 x MS Medium oder auf 0,5 x MS Medium mit 10 µM ACC angezogene, Pflanzen wurden für 0, 4, 8 und 16 Stunden mit 100 µM CHX behandelt.

Da die Spuren des SDS-Gels gleichmäßig beladen waren (Abb. 22B), konnten die MTN1 Banden auf dem Westernblot direkt miteinander verglichen werden. In den Wurzeln der unbehandelten Wildtyppflanzen war eine höhere

Menge an MTN1 Protein vorhanden, als in den Wurzeln der, mit 10 μ M ACC, behandelten Pflanzen (Abb. 22A).

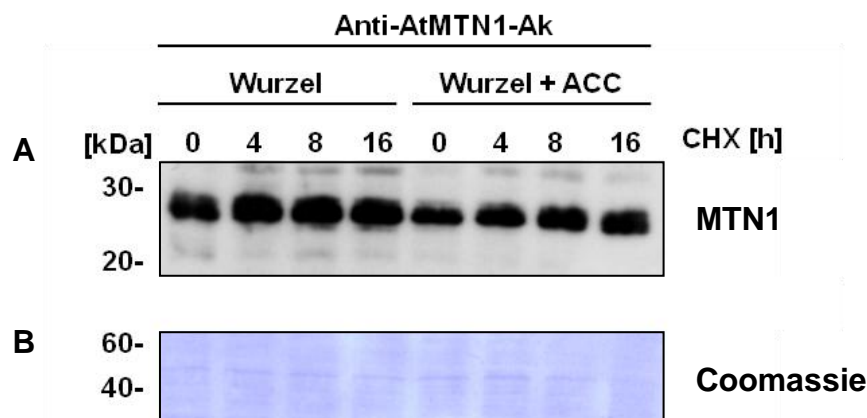


Abbildung 22: MTN1 zeigt keine Degradation bei 16 Stunden CHX Behandlung.

Nachweis von MTN1 in verschiedenen Proteinextrakten von 14 Tage alten Arabidopsiswurzeln über Westernblot. Die Pflanzen wurden für 14 Tage auf 0,5 x MS Medium oder 0,5 x MS Medium mit 10 μ M ACC angezogen und für 0, 4, 8 oder 16 Stunden [h] mit 100 μ M Cycloheximid (CHX) behandelt. (A) Gezeigt ist ein repräsentativer Blot, zur Bestätigung der Ergebnisse wurde ein weiteres Experiment mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt (siehe Anhang 2). (B) Als Beladungskontrolle wurde die verwendete Membran mit Coomassie gefärbt.

In den Wurzeln der für 4, 8 oder 16 Stunden mit 100 μ M CHX behandelten Pflanzen gab es bei Anzucht ohne ACC keine Veränderungen in der MTN1 Proteinmenge. Bei Wachstum auf 10 μ M ACC war in den Wurzeln der für 4, 8 oder 16 Stunden mit 100 μ M CHX behandelten Pflanzen eine leichte, kontinuierliche Erhöhung der MTN1 Proteinmenge zu beobachten (Abb. 22A).

Um die Wirksamkeit des verwendeten CHX zu kontrollieren, wurde zu einigen Zeitpunkten vom Wildtyp ohne ACC Behandlung RNA isoliert. Mit der in cDNA umgeschriebenen RNA wurden PCR Reaktionen mit den Oligonukleotiden für *ADH1* angesetzt (Tabelle 3). Als Kontrolle wurden Oligonukleotide für *Aktin2* verwendet. *Aktin2* Transkript bleibt bei Behandlung mit CHX für mindestens drei Stunden unverändert (Kurihara et al, 2009).

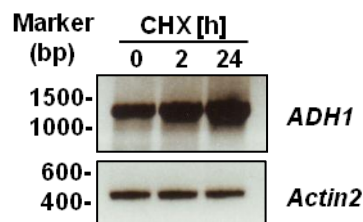


Abbildung 23: CHX Behandlung über 24 Stunden führt zu einem Anstieg von *ADH1* Transkript.

Die Pflanzen wurden für 14 Tage auf 0,5 x MS Medium angezogen und für 0, 2, oder 24 Stunden [h] mit 100 μ M Cycloheximid (CHX) behandelt. Aus den Wurzeln wurde RNA isoliert und jeweils 1 μ g über reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die in einer PCR amplifizierten Fragmente von *ADH1* und *Actin2* wurden über ein Agarosegel aufgetrennt. *Actin2* diente hierbei als Kontrolle.

Bei Behandlung mit 100 μ M CHX für 2 und 24 Stunden konnte in den Wurzeln der 14 Tage alten Pflanzen ein Anstieg der *ADH1* Transkriptmengen im Vergleich zu den Wurzeln der unbehandelten Pflanzen beobachtet werden. Die höchste Menge an *ADH1* Transkript ist in den Wurzeln der für 24 Stunden mit 100 μ M CHX behandelten Pflanzen zu sehen (Abb. 23).

Um die Auswirkungen von CHX auf die Aktivität der MTA-Nukleosidase in Wurzeln von 14 Tage alten Wildtyppflanzen zu untersuchen, wurden Pflanzen für 4, 8, und 16 Stunden [h] mit 100 μ M CHX behandelt (Abb. 24). Als Kontrollen wurden sowohl unbehandelte Wildtyppflanzen als auch Wildtyppflanzen die für 14 Tage auf 10 μ M ACC angezogen wurden, verwendet (Abb. 24).

Im Vergleich mit den unbehandelten Wildtyppflanzen war die MTN-Aktivität in den Wurzeln der für 14 Tage auf 10 μ M ACC angezogenen Pflanzen um 51% reduziert. Nach vier Stunden Behandlung mit CHX war die MTN-Aktivität in den Wurzeln der auf 10 μ M ACC angezogenen Pflanzen um 38% im Vergleich zu den Wildtyppflanzen reduziert. Die Wurzeln der auf 10 μ M ACC angezogenen Wildtyppflanzen zeigten nach 8 und 16 Stunden eine leichte, aber nicht signifikante Reduktion in der MTN-Aktivität im Vergleich zu ihren Kontrollen. Die Wurzeln der auf 0,5 x MS und der auf 0,5 x MS mit 10 μ M ACC

angezogenen Pflanzen, die für 4, 8 und 16 Stunden mit 100 μM CHX behandelt wurden, zeigten keine signifikante Veränderung in der MTN-Aktivität, im Vergleich zu den Wurzeln der nicht mit CHX behandelten Pflanzen (Abb. 24).

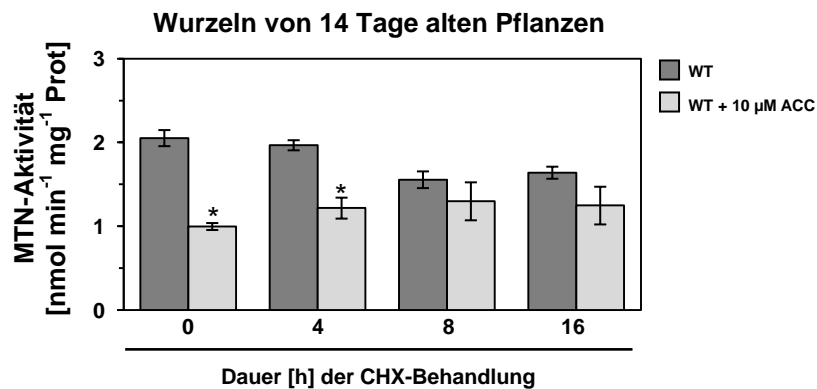


Abbildung 24: Behandlung mit CHX über 16 Stunden führt zu keiner signifikanten Veränderung der MTN-Aktivität.

MTN-Aktivität in den Wurzeln von 14 Tage alten Wildtyp Pflanzen. Die Pflanzen wurden auf 0,5 x MS Medium oder 0,5 x MS Medium mit 10 μM ACC angezogen. Zusätzlich wurden die Pflanzen für 0, 4, 8, und 16 Stunden [h] mit 100 μM CHX behandelt. Die dargestellten MTN-Aktivitäten sind Mittelwerte (\pm Standardfehler, $p < 0,05$, ANOVA) aus zwei biologischen Wiederholungen pro Zeitpunkt mit je $n=3$. Die (*) markieren signifikante Unterschiede der auf ACC angezogenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp ohne ACC.

Um den Abbau von MTN1 weiter zu untersuchen, wurden Wildtyppflanzen auf 0,5 x MS Medium und 0,5 x MS Medium mit 10 μM ACC angezogen und für 0, 24, 48 und 72 Stunden [h] mit 100 μM CHX behandelt (Abb. 25). Als Kontrollen wurden sowohl unbehandelte Wildtyppflanzen, als auch Wildtyppflanzen die für 14 Tage auf 10 μM ACC angezogen wurden, verwendet (Abb. 25).

In den unbehandelten Wildtyppflanzen war die MTN-Aktivität in den Wurzeln der für 14 Tage auf 10 μM ACC angezogenen Pflanzen um 46% reduziert. Nach 24 stündiger Behandlung mit 100 μM CHX war die MTN-Aktivität in den Wurzeln der auf 10 μM ACC angezogenen Pflanzen um 45% reduziert, im Vergleich zu den Wildtyppflanzen. Die Wurzeln der auf 10 μM ACC angezogenen Wildtyppflanzen zeigten im Vergleich zu den Wurzeln der Pflanzen auf Medium ohne ACC nach 48 eine 40%ige und nach 72 Stunden eine 48%ige Reduktion in der MTN-Aktivität. Die Wurzeln der auf 0,5 x MS und

der auf 0,5 x MS mit 10 μ M ACC angezogenen Pflanzen, die für 24, 48, oder 72 Stunden mit 100 μ M CHX behandelt wurden, zeigten keine signifikanten Veränderung in der MTN-Aktivität, im Vergleich zu ihren Kontrollen (Abb. 25).

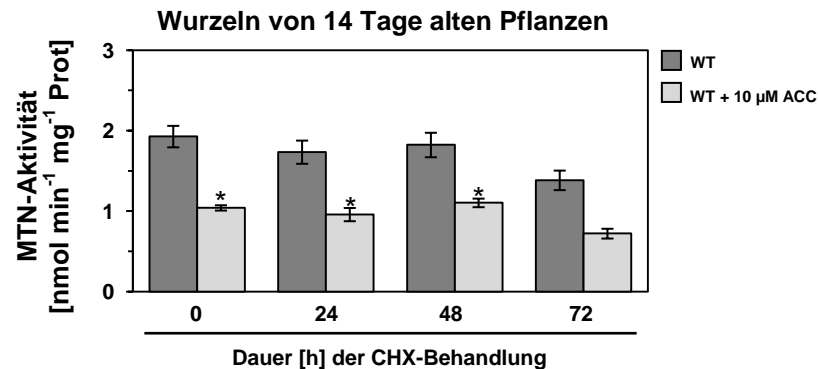


Abbildung 25: Behandlung mit CHX über 72 Stunden führt zu keiner signifikanten Veränderung der MTN-Aktivität.

MTN-Aktivität in den Wurzeln von 14 Tage alten Wildtyp Pflanzen. Die Pflanzen wurden auf 0,5 x MS Medium oder 0,5 x MS Medium mit 10 μ M ACC angezogen. Zusätzlich wurden die Pflanzen für 0, 24, 48 und 72 Stunden [h] mit 100 μ M CHX behandelt. Die dargestellten MTN-Aktivitäten sind Mittelwerte (\pm Standardfehler, $p < 0,001$, ANOVA) aus zwei biologischen Wiederholungen pro Zeitpunkt mit je $n=3$. Die (*) markieren signifikante Unterschiede der auf ACC angezogenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp ohne ACC.

Unterschiede in den Proteinmengen können nicht nur durch Veränderungen im Proteinabbau, sondern auch durch Unterschiede in der Translationseffizienz entstehen. Zur Analyse der Translationseffizienz von MTN1 wurden Experimente mit MG132 durchgeführt. MG132 verhindert den Proteinabbau durch Inhibierung des 26S Proteasoms (Zhang et al., 2011). 14 Tage alte, auf 0,5 x MS Medium oder auf 0,5 x MS Medium mit 10 μ M ACC angezogene, Pflanzen, wurden für 0, 4, 8 und 16 Stunden mit 100 μ M MG132 behandelt.

Durch die gleichmäßige Beladung in den Spuren der zum Blotten verwendeten Membran (Abb. 26B), konnten die MTN1 Banden auf dem Westernblot direkt miteinander verglichen werden. Die Wurzeln der unbehandelten Wildtyppflanzen zeigten eine höhere Menge an MTN1 Protein, als die Wurzeln der mit 10 μ M ACC behandelten Pflanzen (Abb. 26A). In den Wurzeln der für 4, 8 oder 16 Stunden mit 100 μ M MG132 behandelten Pflanzen

akkumulierte MTN1 unabhängig von dem Wachstum auf 10 μM ACC (Abb. 26A).

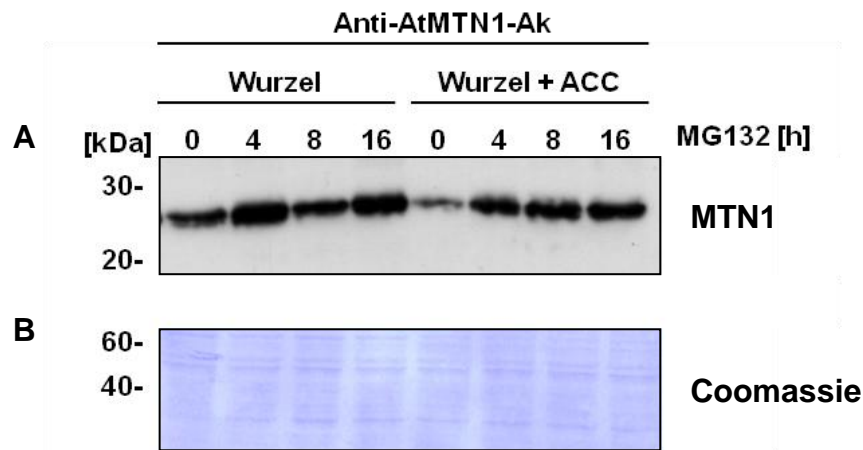


Abbildung 26: Behandlung mit MG132 führt zur Akkumulation von MTN1 in der Wurzel. Nachweis von MTN1 in verschiedenen Proteinextrakten von 14 Tage alten Arabidopsiswurzeln über Westernblot. Die Pflanzen wurden für 14 Tage auf 0,5 x MS Medium oder 0,5 x MS Medium mit 10 μM ACC angezogen und für 0, 4, 8 oder 16 Stunden [h] mit 100 μM MG132 behandelt. (A) Gezeigt ist ein repräsentativer Blot. Zur Kontrolle der Ergebnisse wurde ein weiteres Experiment mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt (siehe Anhang 3). (B) Als Beladungskontrolle wurde die verwendete Membran mit Coomassie gefärbt.

Zur Analyse der MTN-Aktivität bei Inhibierung des proteasomenabhängigen Proteinabbaus wurden Wurzeln von 14 Tage alten Wildtyppflanzen untersucht. Die Pflanzen wurden auf 0,5 x MS Medium oder 0,5 x MS Medium mit 10 μM ACC angezogen und für 0 (Kontrolle), 4, 8 und 16 Stunden mit 100 μM MG132 behandelt (Abb. 27).

Im Vergleich zu der MTN-Aktivität in unbehandelten Wildtyppflanzen war die MTN-Aktivität in den Wurzeln von auf 10 μM ACC angezogenen Wildtyppflanzen um 45% reduziert (Abb. 27). In den Wurzeln von Pflanzen, die auf 0,5 x MS Medium mit 10 μM ACC angezogen wurden und für 4, 8 oder 16 Stunden mit 100 μM MG132 behandelt wurden, war die MTN-Aktivität um 26% bei vier Stunden, um 32% bei acht Stunden und um 57% bei 16 Stunden reduziert, im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen ohne ACC (Abb. 27).

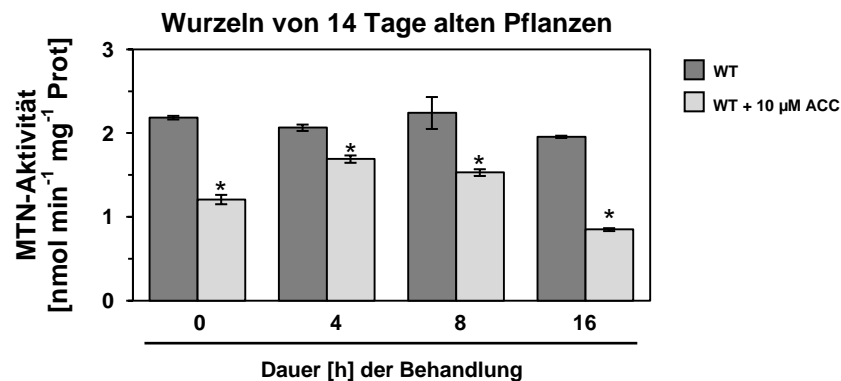


Abbildung 27: Behandlung mit MG132 über 16 Stunden führt zu keiner signifikanten Veränderung der MTN-Aktivität.

MTN-Aktivität in den Wurzeln von 14 Tage alten Wildtyp Pflanzen. Die Pflanzen wurden auf 0,5 x MS Medium angezogen. Zusätzlich wurden einige Pflanzen für 0, 4, 8, und 16 Stunden [h] mit 100 µM MG132 behandelt. Die dargestellten MTN-Aktivitäten sind Mittelwerte (\pm Standardfehler, $p < 0,05$, ANOVA) aus drei biologischen Wiederholungen zu jedem gemessenen Zeitpunkt. Die (*) markieren signifikante Unterschiede der auf ACC angezogenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp ohne ACC.

Die MTN-Aktivität in den Wurzeln von 14 Tage alten auf 10 µM ACC angezogenen Pflanzen, welche mit 100 µM MG132 behandelt wurden, stieg bei vierstündiger Behandlung an. Nach acht Stunden Behandlung lag die MTN-Aktivität leicht unter dem Wert der vierstündigen Behandlung. Nach 16 Stunden Behandlung mit 100 µM MG132 lag die MTN-Aktivität unter der Aktivität der Kontrolle (Abb. 27).

Die Ethylenantwort, nicht die Ethylenproduktion, ist für die Regulation der MTN-Aktivität verantwortlich

Um zu untersuchen, ob die MTN-Aktivität durch die Ethylenbiosynthese reguliert wird, oder die Regulation vom Ethylensignalweg ausgeht, wurden die Ethylenbiosynthese- und Ethylensignalwegsmutanten *eto3*, *ctr1* und *ein2* verwendet. Für die Analysen wurden 14 Tage alte Pflanzen verwendet, die auf schwefelreduziertem Medium mit 500 μM Sulfat oder 500 μM MTA angezogen wurden. Zusätzlich wurden Pflanzen fünf Tage nach der Keimung mit 5 ppm 1-MCP, welches die Ethylenrezeptoren hemmt, behandelt (Abb. 28).

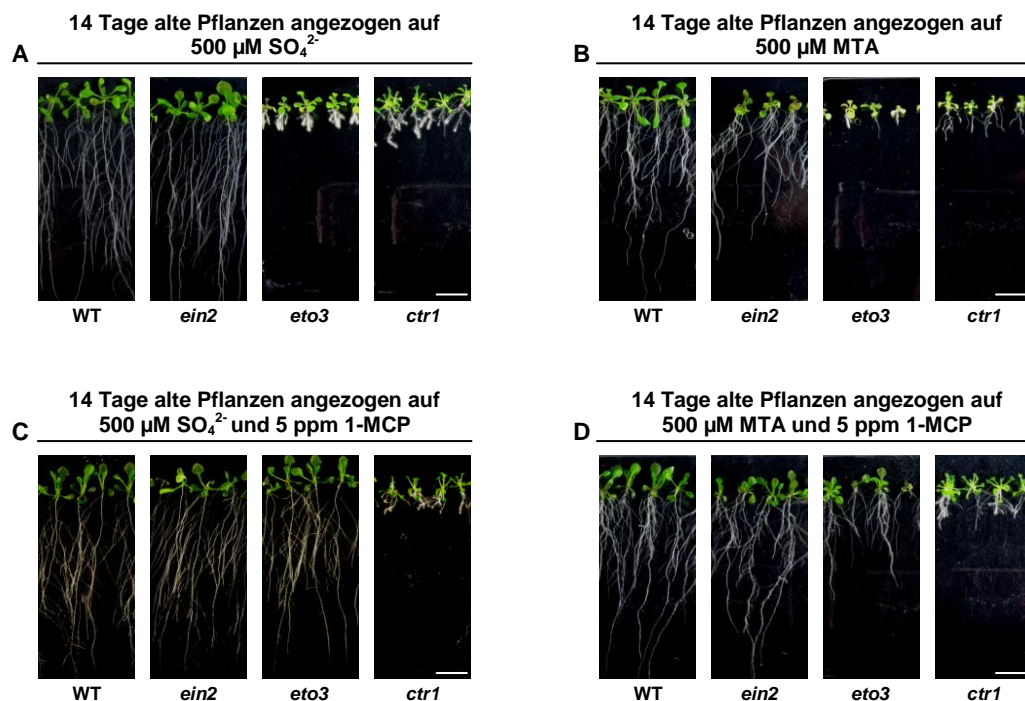


Abbildung 28: Wachstum und Entwicklung von 14 Tage alten Wildtyp, *ein2*, *eto3* und *ctr1* Pflanzen auf SO_4^{2-} und MTA.

Die Pflanzen wurden für 14 Tage auf schwefelreduziertem Medium mit (A+C) 500 μM SO_4^{2-} oder (B+D) 500 μM MTA als zusätzlicher Schwefelquelle angezogen. Zusätzlich wurden die Pflanzen in C und D ab dem fünften Tag nach der Keimung mit 5 ppm 1-MCP behandelt. Gezeigt sind repräsentative Pflanzen aus drei biologischen Wiederholungen. Die Größenbalken repräsentieren 1 cm.

Auf Medium, dem 500 μM MTA (Abb. 28B) zugesetzt war, zeigten die Wildtyppflanzen eine geringfügige Wachstumsreduktion, im Vergleich zum Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} (Abb. 28A). Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} mit zusätzlicher 1-MCP-Behandlung (Abb. 28C) führte beim Wildtyp zu einer Verbesserung des Wurzelwachstums, im Vergleich zum Wachstum ohne 1-MCP (Abb. 28A). Das Wurzelsystem der mit 1-MCP behandelten Pflanzen erschien verzweigter. Bei Wachstum auf 500 μM MTA mit zusätzlicher 1-MCP-Behandlung (Abb. 28D) gab es beim Wildtyp keine Wachstumsunterschiede im Vergleich zum Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} . Die Pflanzen der *ein2* Mutante verhielten sich wie der Wildtyp. Ohne 1-MCP-Behandlung zeigten die *eto3* Mutante ein reduziertes Spross- und Wurzelwachstum (Abb. 28A+B). Durch Behandlung mit 5 ppm 1-MCP konnte das reduzierte Wachstum der *eto3* Mutante auf 500 μM SO_4^{2-} komplett, und auf 500 μM MTA teilweise komplementiert werden (Abb. 28C+D). Die Pflanzen der *ctr1* Mutante zeigten auf 500 μM SO_4^{2-} (Abb. 28A+C) und auf 500 μM MTA (Abb. 28B+D) unabhängig von der Behandlung mit 5 ppm 1-MCP ein reduziertes Wachstum.

Zusätzlich zur morphologischen Analyse der Wurzeln des Wildtyps, der *ein2*, der *eto3* und der *ctr1* Mutanten bei Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} oder 500 μM MTA mit oder ohne Behandlung mit 5 ppm 1-MCP wurde die MTN-Aktivität in den Wurzeln der Pflanzen untersucht (Abb. 29). Die MTN-Aktivität in den Wurzeln des Wildtyps war bei Wachstum auf 500 μM MTA, im Vergleich zum Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} , um 27% erhöht. Behandlung mit 5 ppm 1-MCP führte in den Wurzeln der auf 500 μM SO_4^{2-} angezogenen Wildtyppflanzen zu einer Erhöhung der MTN-Aktivität um 39% im Vergleich zu den unbehandelten Pflanzen. Zusätzliche Behandlung mit 5 ppm 1-MCP bei Wachstum auf 500 μM MTA führte zu keiner Veränderung der MTN-Aktivität in den Wurzeln, im Vergleich zu den unbehandelten Wildtyppflanzen (Abb. 29).

Die MTN-Aktivität in den Wurzeln der *ein2* Mutanten zeigte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Wurzeln der Wildtyppflanzen. Bei Wachstum auf 500 μM MTA zeigten die *ein2* Mutanten eine um 23% erhöhte MTN-Aktivität in den Wurzeln, im Vergleich zur MTN-Aktivität bei Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} . Behandlung mit 5 ppm 1-MCP führte bei

Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} und 500 μM MTA zu einer Erhöhung um 22% und 7% der MTN-Aktivität in den Wurzeln der *ein2* Mutanten im Vergleich zu den Wurzeln der unbehandelten Pflanzen (Abb. 29).

Die Wurzeln der *eto3* Mutanten zeigten, bei Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} und 500 μM MTA eine um 25% und um 32% verringerte MTN-Aktivität im Vergleich zu der MTN-Aktivität in den Wurzeln des Wildtyps bei diesen Wachstumsbedingungen. Behandlung mit 5 ppm 1-MCP komplementierte die verringerte MTN-Aktivität in den Wurzeln der *eto3* Mutanten. Nach der Behandlung mit 1-MCP war die MTN-Aktivität in den Wurzeln der *eto3* Mutanten auf 500 μM SO_4^{2-} um 7% geringer als in den Wurzeln des Wildtyps und auf 500 μM MTA um 1% erhöht (Abb. 29).

In den Wurzeln der *ctr1* Mutanten war die MTN-Aktivität unabhängig vom verwendeten Medium und der Behandlung mit 1-MCP immer mindestens 20% geringer als in den Wurzeln der jeweiligen Wildtyppflanzen bei entsprechender Behandlung. Wachstum auf 500 μM MTA induziert die MTN-Aktivität in den Wurzeln der *ctr1* Mutanten um 27% im Vergleich zum Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} . Behandlung mit 5 ppm 1-MCP hat weder bei Wachstum auf 500 μM SO_4^{2-} noch bei Wachstum auf 500 μM MTA Auswirkungen auf die MTN-Aktivität in den Wurzeln der *ctr1* Mutanten im Vergleich zu den unbehandelten Pflanzen.

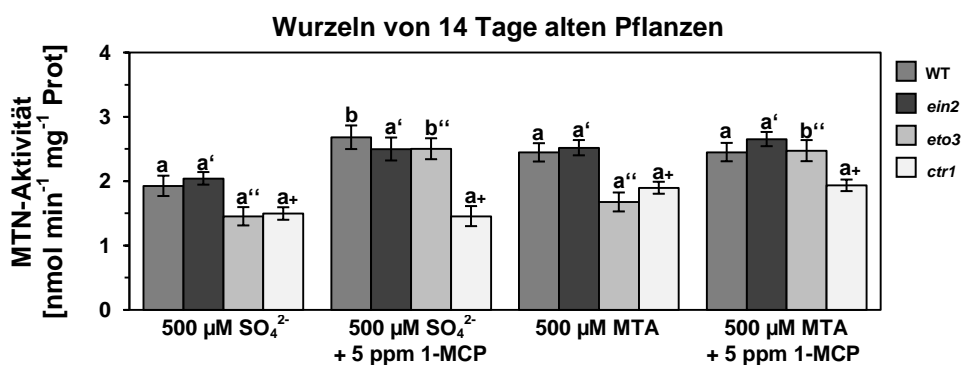


Abbildung 29: Die MTN-Aktivität in Wurzeln ist abhängig von der Ethylenantwort.

Die 14 Tage alten Wildtyp (WT), *ein2*, *eto3* und *ctr1* Pflanzen wurden auf schwefelreduziertem Medium mit 500 μM SO_4^{2-} oder 500 μM MTA angezogen. Die Behandlung mit 5 ppm 1-MCP wurde ab dem fünften Tag nach der Keimung in gasdichten Boxen durchgeführt. Die dargestellten MTN-Aktivitäten sind Mittelwerte (\pm Standardfehler, $p < 0,001$, ANOVA) aus fünf biologischen Wiederholungen mit je $n=3$. Die Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede in der MTN-Aktivität in den Wurzeln von (a) WT, (a') *ein2*, (a'') *eto3* und (a+) *ctr1* Pflanzen im Vergleich zur Anzucht auf 500 μM SO_4^{2-} .

Kalzium inhibiert die MTN-Aktivität in *Arabidopsis thaliana*

MTN1 aus *Arabidopsis* interagiert mit dem Kalziumsensorprotein CALCINEURIN B-LIKE 3 (CBL3). Durch diese Interaktion wird die Aktivität von MTN1 *in vitro* in Anwesenheit von Kalzium inhibiert. Ohne Kalzium kommt es zu keiner Inhibierung der MTN-Aktivität (Oh et al., 2008).

Zur Analyse des Einflusses von Kalzium auf die MTN-Aktivität in Gesamtprotein-Extrakten wurden 14 Tage alte Pflanzen verwendet. Als Kalziumquelle wurde 1 mM CaCl_2 verwendet (Abb. 30). Als Kontrollansatz wurden Pflanzenextrakte mit 2 mM EGTA behandelt. EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure) ist ein Komplexbildner der doppelwertigen Kationen bindet, ähnlich dem EDTA. EGTA besitzt, im Vergleich zu EDTA, eine höhere Affinität für die Bindung von Kalziumionen.

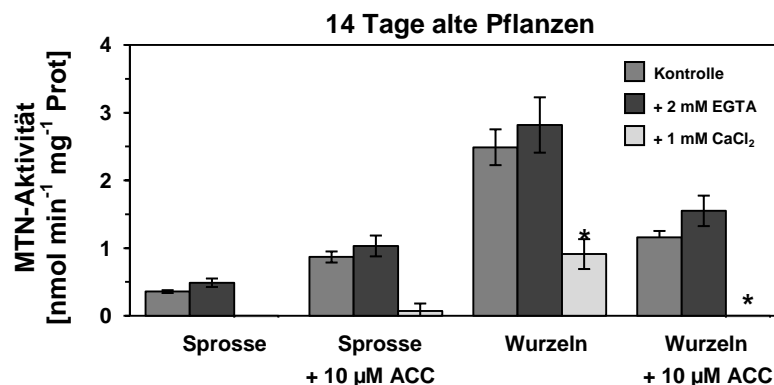


Abbildung 30: Kalzium hemmt die MTN-Aktivität in Spross und Wurzel.

MTN-Aktivität in Wurzeln und Sprossen von 14 Tage alten Wildtyp Pflanzen. Die Pflanzen wurden auf 0,5 x MS Medium oder 0,5 x MS Medium mit 10 µM ACC angezogen. Zusätzlich wurden Pflanzenextrakte für eine halbe Stunde mit 2 mM EGTA oder 1 mM CaCl_2 behandelt. Die dargestellten MTN-Aktivitäten sind Mittelwerte (\pm Standardfehler, $p < 0,001$, ANOVA) aus zwei biologischen Wiederholungen mit je $n=3$. Signifikante Unterschiede zu den jeweiligen Kontrollen sind mit (*) markiert.

In den Sprossen von im Licht angezogenen 14 Tage alten *Arabidopsis* Wildtyppflanzen, war die MTN-Aktivität im Vergleich zu der MTN-Aktivität in den Wurzeln, um 85% geringer. In den Sprossen der mit 10 μ M ACC behandelten Pflanzen konnte eine Erhöhung der MTN-Aktivität um 140% beobachtet werden. In den Wurzeln der 14 Tage alten Wildtyppflanzen führte die Behandlung mit 10 μ M ACC zu einer Reduktion der MTN-Aktivität, im Vergleich zu der MTN-Aktivität in Wurzeln von unbehandelten Pflanzen, um 50% (Abb. 30). Die Zugabe von 2 mM EGTA führte in den Proteinextrakten aus 14 Tage alten Sprossen zu einer Erhöhung der MTN-Aktivität von 18% mit ACC-Behandlung und 36% ohne ACC-Behandlung im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. Die Zugabe von 1 mM Kalziumchlorid führte in allen untersuchten Proben zu einer Reduktion der MTN-Aktivität, unabhängig vom verwendeten Gewebe oder der Behandlung mit 10 μ M ACC (Abb. 30).

Die verwendete Kalziumkonzentration von 1 mM, lag über der Konzentration an Kalzium im Zytoplasma. Aus diesem Grund wurde über eine Konzentrationsreihe mit Kalziumchlorid untersucht, ob geringere Mengen an Kalzium einen inhibierenden Einfluss auf die MTN-Aktivität in Pflanzenextrakten aus 14 Tage alten Wurzeln ausüben können (Abb. 31).

Die MTN-Aktivität in Pflanzenextrakten aus 14 Tage alten Wurzeln, welche mit 10 μ M ACC behandelt wurden war reduziert, im Vergleich zu der MTN-Aktivität aus Pflanzenextrakten von unbehandelten Wurzeln. Die Zugabe von 500 und 1000 μ M CaCl_2 hatte eine signifikante Reduktion der MTN-Aktivität zur Folge. Die Reduktion der MTN-Aktivität war unabhängig von der Behandlung mit 10 μ M ACC. Die Behandlung der Pflanzenextrakte aus den 14 Tage alten Wurzeln mit 100 μ M CaCl_2 führte ohne ACC-Behandlung zu einer 15%igen Reduktion und mit ACC-Behandlung zu einer 27%igen Reduktion der MTN-Aktivität. Die Zugabe von 1 und 10 μ M CaCl_2 hatte keine Auswirkungen auf die Aktivität der MTA Nukleosidase im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 31).

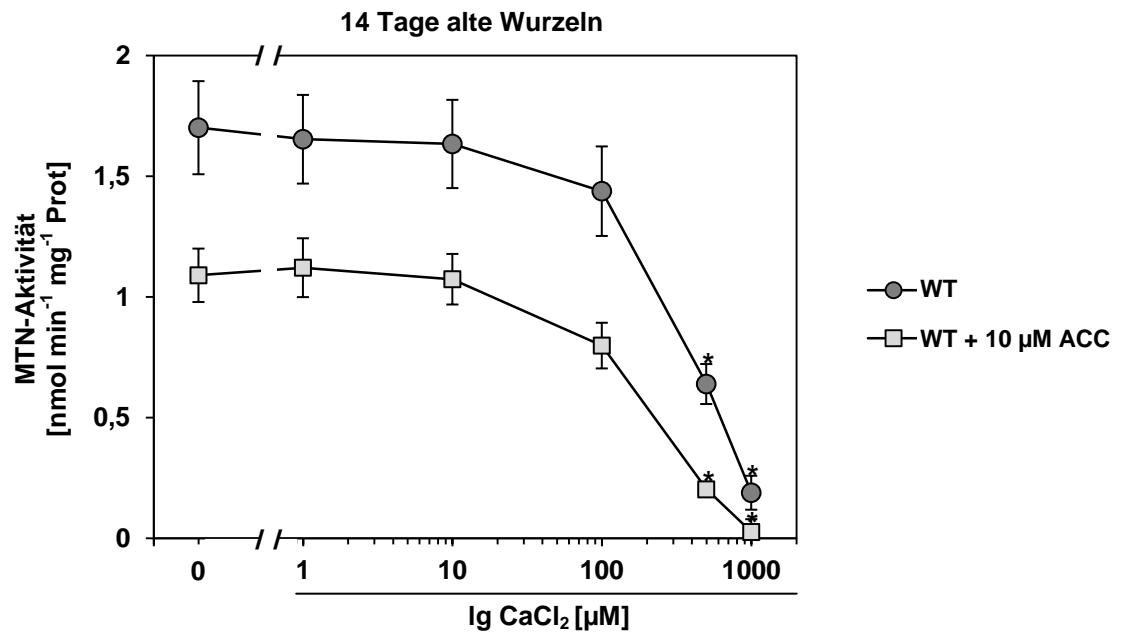


Abbildung 31: Kalzium hemmt die MTN-Aktivität konzentrationsabhängig.

Die 14 Tage alten Wildtyp (WT) Pflanzen wurden auf 0,5 x MS Medium oder 0,5 x MS Medium mit 10 μM ACC angezogen. Zusätzlich wurden Pflanzenextrakte mit 0, 1, 10, 100, 500 oder 1000 μM CaCl₂ behandelt. Die dargestellten MTN-Aktivitäten sind Mittelwerte (±Standardfehler, $p < 0,001$, ANOVA) aus drei biologischen Wiederholungen mit je $n=3$. Signifikante Unterschiede in der MTN-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen die nicht mit CaCl₂ behandelt wurden sind mit (*) markiert

DISKUSSION UND AUSBLICK

Der Methioninzyklus ist ein Teil des Schwefelmetabolismus in Mikroorganismen, pflanzlichen und tierischen Organismen. Durch den Methioninzyklus haben die Organismen die Möglichkeit bereits reduzierten Schwefel aus Methylthioadenosin (MTA), dem Nebenprodukt vieler S-Adenosylmethionin (SAM)-abhängigen Reaktionen, über eine Reihe von enzymatischen Reaktionen zu Methionin zu recyceln. Die Forschung am Methioninzyklus begann bereits in den 1970er Jahren (Baur und Yang, 1969; 1972; Wang et al., 1982). In vielen Organismen, wie zum Beispiel den Bakterien *Bacillus subtilis* (Sekowska und Danchin, 2002; Tamura et al., 2008) und *Klebsiella pneumoniae* (Cornell et al., 1996), den Pflanzen *Oryza sativa* (Sauter et al., 2004, 2005; Rzewuski et al., 2007) und *Arabidopsis thaliana* (Sauter et al., 2004; Bürstenbinder et al., 2007, 2010; Pommerrenig et al., 2011) oder auch in Säugern wie *Mus musculus* und *Homo sapiens*, sind die meisten der für die am Methioninzyklus beteiligten Enzyme kodierenden Gene entdeckt und charakterisiert (Albers, 2009).

Zu den bereits beschriebenen Regulationen zwischen Methioninzyklus und den MTA-produzierenden Stoffwechselwegen zählt die Akkumulation des Transkripts der Acireduktion-Dioxygenase1 (ARD1) aus Reis (*Oryza sativa* L.) durch Ethylenbehandlung (Sauter et al., 2005). Aus Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) ist bekannt, dass die Enzymaktivität der MTA-Nukleosidase (MTN) während der Fruchtreife parallel zu den Metabolitspiegeln von Putrescin und Spermidin ansteigt, während die Aktivität der Methylthioribose-Kinase (MTK) parallel mit der Produktion von Ethylen verläuft (Saftner und Baldi, 1990; Kushad et al., 1985). In *Arabidopsis* ist über die Regulation des Methioninzyklus oder die regulierenden Wirkungen des Methioninzyklus auf andere Stoffwechselwege noch wenig bekannt.

In dieser Arbeit wurden mögliche Regulationen zwischen Methioninzyklus, der Polyaminbiosynthese, der Ethylenbiosynthese und dem Ethylensignalweg in *Arabidopsis thaliana* untersucht. Der Hauptteil der Analysen fand, im Gegensatz zu vorherigen Untersuchungen, an Wurzeln statt.

***mtn1* Mutanten haben ein reduziertes Wurzelwachstum**

Der Eingangsschritt des Methioninzyklus wird von der Methylthioadenosin-Nukleosidase (MTN) katalysiert. Unter Abspaltung von Adenin entsteht Methylthioribose (MTR), welche in mehreren Schritten zu Methionin recycelt wird. MTN wird in Arabidopsis von zwei Genen kodiert, die Enzyme machen jeweils 80% (MTN1) und 20% (MTN2) der Gesamtaktivität aus. *mtn1* Mutanten haben bei Wachstum auf MTA ein reduziertes Wachstum, während sich *mtn2* Mutanten nicht vom Wildtyp unterscheiden (Bürstenbinder et al., 2010). Wie schon in früheren Analysen wurden in dieser Arbeit Untersuchungen an T-DNA-Insertionsmutanten von *MTN1* und *MTN2* durchgeführt. Ebenso wie das Sprosswachstum ist das Wurzelwachstum von 14 Tage alten *mtn1* Mutanten bei Anzucht auf MTA signifikant reduziert (Abb. 4). Die Anzucht auf MTA führt auch in Wildtyp und *mtn2* Pflanzen zu einer Reduktion von Spross- und Wurzelwachstum.

Die Wachstumsreduktion der *mtn1* Mutanten auf MTA zeigt Ähnlichkeiten zu der Wachstumsreduktion von Mutanten des Ethylensignalwegs. Die Ethylen-überproduzierende Mutante *eto3* und die *ctr1* Mutante, welche eine dauerhaft aktivierte Ethylenantwort besitzt, sind beide im Wachstum reduziert (Bürstenbinder et al., 2007; Kieber et al., 1993). Um zu untersuchen, ob der *mtn1* Wurzelphänotyp auf Veränderungen im Ethylensignalweg durch vermehrte Ethylenproduktion zurückzuführen ist, wurde der Ethylensignalweg durch Behandlung mit 1-Methylcyclopropen (1-MCP) gehemmt. 1-MCP verhindert die Bindung von Ethylen an die Ethylenrezeptoren und unterbindet die Ethylenantwort (Blankenship und Dole, 2003; Sisler und Serek, 1997). Die Wurzeln auf MTA angezogener *mtn1-1* Pflanzen zeigten keine Unterschiede im Wachstum bei Behandlung mit 1-MCP im Vergleich zu den Wurzeln der unbehandelten Pflanzen (Abb. 6). Ein dauerhaft aktiver Ethylensignalweg durch eine erhöhte Ethylenproduktion in den Wurzeln, scheint somit nicht verantwortlich für das reduzierte Wurzelwachstum der *mtn1* Mutanten bei Wachstum auf MTA.

Es wäre denkbar, dass die Reduktion im Wachstum von *mtn1* Mutanten auf ein verringertes Streckungswachstum zurückzuführen ist. Auxin ist unter

anderem in sich differenzierendem Gewebe für das Streckungswachstum verantwortlich (Kende und Zeevaart, 1997). Um zu untersuchen, ob das reduzierte Wachstum der *mtn1* Mutanten auf eine Veränderung in der Auxinverteilung oder Auxinproduktion zurückzuführen ist, wurde der *DR5* Promotor herangezogen (Ulmasov et al., 1997). Der synthetische Promotor *DR5* wird für den Nachweis von aktivem Auxin im Gewebe und Auxin-induzierter Genexpression verwendet (Sabatini et al., 1999; Friml et al., 2002; Marchant et al., 2002). Es wurden *mtn1-1/P_{DR5}::GUS* und *mtn1-2/P_{DR5}::GUS* Linien generiert und die GUS-Aktivität mit den Pflanzen der *P_{DR5}::GUS* Linie verglichen (Ljung et al., 2001). Die Linien der *mtn1-1/P_{DR5}::GUS* und der *mtn1-2/P_{DR5}::GUS* Mutanten zeigten keine Unterschiede in der GUS-Aktivität in den Wurzelspitzen im Vergleich zu den Pflanzen der *P_{DR5}::GUS* Linie. GUS-Aktivität war in den Wurzelspitzen mit und ohne MTA vergleichbar (Abb. 7). Der *mtn1* Wurzelphänotyp scheint nicht durch eine veränderte Verteilung von aktivem Auxin bedingt zu sein.

Die bereits beschriebene Doppelmutante *mtn1-2/mtn2-1* zeigt im Leitgewebe eine erhöhte Anzahl an Xylem-, Phloem- und Kambiumzellen (Waduware-Jayabahu et al., 2012). Diese Veränderungen waren vergleichbar mit den Veränderungen im Leitgewebe der Mutanten *thick vein (tkv*; Clay und Nelson, 2005) und *acaulis5 (acl5*; Hanzawa et al., 1997; Kakehi et al., 2008), welche in der Bildung des Sperminisomers Thermospermin gestört sind. Die veränderte Anzahl an Zellen im Leitgewebe von *tkv* und *acl5* wird auf eine Reduktion des polaren Auxintransports zurückgeführt. Polarer Auxintransport ist wichtig für die Definition von Leitbündelzellen und Mesophyllzellen bei der Ausdifferenzierung (Clay und Nelson, 2005). Diese Hypothese wurde durch Messungen des polaren Auxintransports in der *tkv* und der *mtn1-1/mtn2-1* Mutante bestätigt. In der *tkv* Mutante war der basipetale Auxintransport um 36%, in der *mtn1-1/mtn2-1* Doppelmutante um 54% reduziert (Waduware-Jayabahu et al., 2012). Zusätzlich zeigten die veränderten Leitbündel Ähnlichkeiten mit den Leitbündeln von Wildtyppflanzen in denen durch Zugabe von 1-N-Naphthylphthalaminsäure (NPA) der polare Auxintransport reduziert wurde (Mattsson et al., 1999). Es ist bis jetzt nicht bekannt, ob in den *mtn1* Mutanten ein reduzierter Auxintransport für das reduzierte Wurzelwachstum

verantwortlich sein könnte. Zur Klärung dieser Frage müsste der polare Auxintransport in den *mtn1* Mutanten bei Wachstum auf MTA gemessen werden.

Ebenso wie ein reduziertes Streckungswachstum könnte eine reduzierte Zellteilungsrate der Grund für das reduzierte *mtn1* Wurzelwachstum sein. Zellteilungsaktivitäten können über die Untersuchung von *CycB1*-Promotoraktivität analysiert werden. Über Promotoraktivität von *CYCB1* werden Zellen nachgewiesen, die sich im Übergang von der G2 in die M Phase der Zellteilung befinden. Cycline der B-Klasse sind spezifisch im Übergang von der G2 in die M Phase der Zellteilung exprimiert und werden über den Ubiquitin-Proteasomenweg abgebaut (Hemerly et al., 1992; Ferreira et al., 1994; Donnelly et al., 1999). Untersucht wurden *mtn1-1/P_{CYCB1}::GUS* und *mtn1-2/P_{CYCB1}::GUS* Linien. Als Vergleich dienten die Pflanzen der *P_{CYCB1}::GUS* Linie. Die Aktivität des *CYCB1* Promotors konnte im Bereich des Wurzelmeristems nachgewiesen werden. Die untersuchten *mtn1-1/P_{CYCB1}::GUS* und *mtn1-2/P_{CYCB1}::GUS* Linien zeigten keine Unterschiede in der Aktivität des *CYCB1* Promotors, im Vergleich zu den Pflanzen der *P_{CYCB1}::GUS* Linie. Unterschiede zwischen dem Wachstum auf SO_4^{2-} und MTA waren nicht zu erkennen (Abb. 7). Das reduzierte Wurzelwachstum von *mtn1* Pflanzen konnte somit nicht auf eine reduzierte Zellteilungsrate zurückgeführt werden.

SAM ist nicht nur Substrat von Methylierungsreaktionen sondern auch der Startpunkt der Polyamin- und Ethylenbiosynthese. Von diesen Biosynthesewegen ist bereits bekannt, dass sie einen Einfluss auf das Wurzelwachstum haben können (Kieber et al., 1993; Wimalasekera et al., 2011b).

Polyamine als Regulatoren des Wurzelwachstums

In Arabidopsis haben die Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin einen fördernden Einfluss auf die Zellteilung, die Blütenentwicklung und das Wurzelwachstum (Heby, 1981; Tabor und Tabor, 1999). Eine reduzierte Metabolisierung von MTA hat einen inhibierenden Einfluss auf die Keimlingsentwicklung von *mtn1* Mutanten und die Samenentwicklung von *mtn1-1/mtn2-1* Doppelmutanten. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass die Behandlung der *mtn1-1/mtn2-1* Blütenknospen mit Spermidin, zu einer signifikanten Verbesserung der Fertilität der Pflanzen führt (Waduware-Jayabahu et al., 2012).

Auf MTA angezogene *mtn1* Pflanzen zeigten ein reduziertes Spross- und Wurzelwachstum (Abb. 4). In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin auf das Wurzelwachstum von Wildtyp, *mtn1-1*, *mtn1-2*, *mtn2-1* und *mtn2-2* Mutanten untersucht. Durch Spermin im Wachstumsmedium konnte das durch MTA gehemmte Wurzelwachstum der *mtn1* Mutanten komplementiert werden (Abb. 9). Putrescin und Spermidin hatten keine erkennbaren Auswirkungen auf das Wurzelwachstum von *mtn1* Mutanten (Abb. 9). Die Zugabe von Spermin konnte das Wurzelwachstum der *mtn1* Mutanten komplementieren, obwohl die internen Gehalte der freien Form von Putrescin, Spermidin und Spermin in den Wurzeln von auf MTA angezogenen Pflanzen erhöht waren (Abb. 8). Die Komplementation des *mtn1* Wurzelwachstums lässt sich also nicht damit erklären, dass die *mtn1* Wurzeln reduzierte Gehalte an freiem Spermin haben, welche durch die Sperminzugabe im Medium komplementiert werden. Anders ist es in der *mtn1-1/mtn2-1* Doppelmutante, wo der Spermidingehalt in den Infloreszenzen im Vergleich zum Wildtyp reduziert war. Die Zugabe von Spermidin scheint diese Reduktion direkt zu komplementieren (Waduware-Jayabahu et al., 2012). In dieser Arbeit wurden nur die freien Polyamine gemessen. Polyamine können nicht nur in freier Form, sondern auch als konjugierte Polyamine vorkommen (Bagni und Tassoni, 2001). Sie sind dann zum Beispiel an Hydroxyzimtsäuren gebunden und müssen separat nachgewiesen werden. Ein solcher Nachweis durch Hydrolyse und Detektion über HPLC ist in dieser Arbeit nicht gelungen.

Zusätzlich könnten die Flussraten zwischen den Polyaminen Putrescin, Spermidin und Spermin verändert sein. Eine solche Veränderung kann durch die alleinige Messung der freien Polyamine ebenfalls nicht analysiert werden.

In den Wurzeln der *mtn1* Mutanten auf MTA war keine Reduktion des Spermidingehalts zu beobachten (Abb. 8). Bei einer Hemmung der Spermidin-Synthase (SPDS) durch MTA, wie sie für tierische Zellen beobachtet wurde (Pegg et al., 1981), wäre eine solche Reduktion im Spermidingehalt zu erwarten gewesen. Die Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin können nicht nur über die Synthese, sondern auch über den Abbau reguliert werden. Der Abbau wird von Kupfer-abhängigen Diamin-Oxidasen (DAOs) und FAD-abhängigen Polyamin-Oxidasen (PAOs) katalysiert. DAOs scheinen für das Wurzelwachstum in *Arabidopsis* wichtig zu sein (Møller und McPherson, 1998; Wimalasekera et al., 2011b). DAOs werden in *Arabidopsis* von 12 Genen kodiert. Diese sind sowohl durch biotische als auch durch abiotische Signale reguliert (Wimalasekera et al., 2011a; Zimmermann et al., 2004). Über den Abbau von Putrescin durch DAOs wird NO produziert. Mutanten, die in einem Gen für DAO gestört waren, zeigten eine reduzierte NO-Produktion und ein reduziertes Wurzelwachstum im Vergleich zu ihren Kontrollen (Wimalasekera et al., 2011a). Ein Indiz für die eventuelle Hemmung der DAOs und PAOs in den Wurzeln von *Arabidopsis* bei Anzucht auf MTA ist der erhöhte Gehalt der Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin (Abb. 8).

Polyamine wie Spermidin und Spermin werden durch PAOs abgebaut. PAOs werden in *Arabidopsis* von fünf Genen kodiert. Das Enzym ist im Apoplasten, im Zytoplasma und in den Peroxisomen lokalisiert (Moschou et al., 2008; Sebela et al., 2001; Tavladoraki et al., 2006; Vera-Sirera et al., 2010). Zwei der identifizierten PAOs in *Arabidopsis* (PAO1, PAO3) weisen Homologien zu PAOs aus tierischen Organismen auf. Diese pflanzlichen PAOs sind ebenso wie ihre tierischen Orthologe in der Lage, die Rückreaktion von Spermin zu Spermidin und von Spermidin zu Putrescin zu katalysieren. (Moschou et al., 2008; Tavladoraki et al., 2006). Eine durch Rückreaktionen bedingte Veränderung der Putrescin- und Spermidingehalte durch Zugabe von Spermidin oder Spermin konnte in dieser Arbeit durch die Messung der freien Polyamine in den Wurzeln, der mit Polyaminen behandelten Pflanzen nicht beobachtet

werden (Abb. 10). Es ist möglich, dass eventuelle Rückmetabolisierungen sich nicht in den Gehalten der freien Polyamine widerspiegeln. Aus diesem Grund kann nicht eindeutig geklärt werden, ob die erhöhten Wurzellängen bei Behandlung mit Spermin wirklich durch Spermin hervorgerufen werden oder ob ein Teil der Komplementation eventuell auf rückmetabolisiertes Spermidin zurückzuführen ist.

Das reduzierte Wurzelwachstum der *mtn1* Mutanten, sowie die Infertilität der *mtn1-1/mtn2-1* Doppelmутanten ließen sich durch Spermin und Spermidin komplementieren (Abb. 9; Waduware-Jayabahu et al., 2012). Das deutet auf einen Zusammenhang der Polyaminbiosynthese mit den beobachteten Veränderungen im Wachstum der *mtn1* Mutanten hin. Es wäre möglich, dass eine Hemmung einzelner Enzyme durch MTA für das reduzierte Wurzelwachstum der *mtn1* Mutanten verantwortlich ist. Es ist bereits bekannt, dass MTA in der Lage ist *in vitro* eine Reihe von Enzymen zu hemmen. Dazu zählen, 1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure-Synthase (ACS), Nicotianamin-Synthase (NAS), Spermidin-Synthase (SPDS) und Spermin-Synthase (SPMS) (Herbik et al., 1999; Miyazaki und Yang, 1987; Pegg et al., 1981; Wu et al., 2008). In dieser Arbeit wurden das Wachstum und die Entwicklung verschiedener Mutanten der Polyaminbiosynthese analysiert. MTA könnte durch die Inhibierung eines der Enzyme der Polyaminbiosynthese zu einer Reduktion von Wurzelwachstum in den *mtn1* Mutanten führen. In diesem Fall sollten die Mutanten, welche diese Enzyme nicht mehr produzieren, einen den *mtn1* Mutanten ähnlichen Phänotyp zeigen. Zusätzlich würde das Wachstum auf MTA diesen Phänotyp nicht weiter verstärken, wenn nur der Ausfall eines Enzyms daran beteiligt ist. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden Mutanten, die jeweils in einem von neun Genen für Enzyme der Polyaminbiosynthese gestört waren, analysiert. Mutanten, bei denen spezifische Gene der Polyaminbiosynthese über T-DNA-Insertion ausgeschaltet wurden, waren für die folgenden Enzyme vorhanden: Spermidin-Synthase1 (*spds1*; Imai et al., 2004), Spermidin-Synthase2 (*spds2-1*, *spds2-2*; Imai et al., 2004), Spermin-Synthase (*spms*; Imai et al., 2004b), Thermospermin-Synthase (*acl5*; Hanzawa et al., 1997), SAM-Decarboxylase1 (*samdc1-1*, *samdc1-2*; Ge et al., 2006), SAM-Decarboxylase2 (*samdc2*; GK-492B08),

SAM-Decarboxylase4 (*samdc4*; Franceschetti et al., 2001), Spermidin-Disinapoylacyltransferase (*sdt*; Luo et al., 2009) und Spermidin-Dicoumaroylacyltransferase (*sct*; Luo et al., 2009). Einzig für *SAMDC3* (*At3g25570*) gab es zum Zeitpunkt der Analysen keine verfügbaren Mutanten.

Keine der untersuchten Mutanten zeigte bei Wachstum auf Sulfat einen den *mtn1* Mutanten ähnlichen Phänotyp (Abb. 11, Abb. 13). Daher ist es unwahrscheinlich, dass eines der untersuchten Gene allein für die Wachstumsreduktion der *mtn1* Mutanten verantwortlich ist. Bei Spermidin-Synthase (2 Gene) und SAM-Decarboxylase (vier Gene) ist nicht auszuschließen, dass es zu einer Redundanz der für dasselbe Enzym kodierenden Gene kommen könnte. Diese Kompensation der Enzymaktivität wäre nur durch Charakterisierung einer Doppel- bzw. Quadrupelmutante auszuschließen.

spds1/spds2 Doppelmутanten sind embryoethal. Die Einzelmутanten zeigen keinen Phänotyp (Imai et al., 2004). Durch eine Behandlung mit Cyclohexylamin (CHA) wäre es möglich, die Embryoethalität zu umgehen und die Inhibierung der SPDS-Aktivität zu analysieren. CHA ist als Inhibitor der SPDS aus Zellkulturen von Tabak bekannt (Kaur-Sawhney et al., 1988). Die Behandlung mit CHA hatte keine Auswirkungen auf das Wachstum von Wildtyp, *spds1-1* und *spds2-1* Pflanzen (Abb. 15). Möglicherweise waren die verwendeten Arabidopsispflanzen nicht in der Lage, das angebotene CHA aufzunehmen. Somit konnte CHA nicht zur weiteren Analyse der Reduktion der SPDS-Aktivität verwendet werden.

Es wäre auch möglich, dass Veränderungen in der PA Biosynthese zu Veränderungen in der Methioninzyklus-Aktivität führen. Als Marker der Aktivität des Methioninzyklus wurde die MTN-Aktivität in den Polyaminbiosynthesemutanten analysiert. In den analysierten Mutanten war keine signifikante Veränderung der MTN-Aktivität zu beobachten (Abb. 12, Abb. 14). Die MTN-Aktivität wird durch das Ausschalten der jeweiligen Enzyme in den untersuchten T-DNA-Insertionslinien nicht beeinflusst. Auch eine Interaktion von Polyaminbiosynthese und Ethylenproduktion konnte mit Ausnahme der *ac15* Mutanten über die Analyse von produziertem Ethylen nicht nachgewiesen werden (Abb. 12, Abb. 14). Die Sprosse der *ac15* Mutanten zeigten bei

Wachstum auf MTA eine veränderte Ethylenproduktion. Es wäre denkbar, dass es sich bei der Reduktion der Ethylenproduktion um ein Artefakt handelt, ausgelöst durch das geringere Sprossvolumen der *ac15* Mutanten.

Obwohl Spermin in der Lage ist, das reduzierte *mtn1* Wurzelwachstum auf MTA zu komplementieren, bleibt der genaue Mechanismus dieser Wachstumsveränderung unverstanden. Die Reduktion des Wurzelwachstums beruht weder auf einer Reduktion der freien Polyamine, noch auf der Inhibierung einzelner Enzyme der Polyaminbiosynthese. Messung der konjugierten Polyamine sowie Messungen der Flussraten könnten helfen, den Einfluss von Spermin auf das *mtn1* Wurzelwachstum besser zu verstehen. Ebenso könnte eine Analyse des Polyaminabbaus über DAOs und PAOs zu neuen Erkenntnissen bezüglich der Regulationsmechanismen beitragen. Ein anderer wichtiger Aspekt zum Verständnis der Regulationen zwischen SAM-abhängigen Synthesewegen und dem Methioninrecycling ist die Analyse der MTA-Nukleosidase (MTN), dem Enzym welches den Eingangsschritt des Methioninzyklus katalysiert.

Regulation des Methioninzyklus durch die Ethylenbiosynthese und den Ethylensignalweg

In Arabidopsis ist relativ wenig bekannt über die Regulation des Methioninzyklus durch die Ethylenbiosynthese bzw. den Ethylensignalweg. In Reis (*Oryza sativa* L.) wird die Transkription von *OsARD1* über Ethylen reguliert (Sauter et al., 2005). In Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) verläuft die Aktivität der Methylthioribose-Kinase (MTK) parallel mit der Ethylenproduktion (Kushad et al., 1985). In Arabidopsis konnte für die Methioninzyklusgene *ARD*, *MTK* und *MTN* keine Regulation auf Transkriptebene im Spross bei Zugabe von Ethylen beobachtet werden (Bürstenbinder et al., 2007). Um der Frage nachzugehen, ob die Ethylenbiosynthese bzw. der Ethylensignalweg einen Einfluss auf die Aktivität der MTA-Nukleosidase (MTN) in Wurzeln haben könnte, wurden in dieser Arbeit die Ethylenmutanten *eto3*, *ein2* und *ctr1*, sowie die Substanzen 1-Aminocyclo-1-carboxylsäure (ACC), Ethylen und 1-MCP verwendet. ACC ist

die direkte Vorstufe des Ethylens, 1-MCP bindet an die Ethylenrezeptoren, so dass es zu keiner Ethylenantwort kommen kann (Sisler, 2006).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ACC im Wachstumsmedium zu einer signifikanten Reduktion der MTN-Aktivität in den Wurzeln von Wildtyppflanzen führt (Abb. 16). Auch durch die Behandlung von Wildtyppflanzen mit Ethylen, wurde die MTN-Aktivität in den Wurzeln signifikant reduziert (Abb. 16). Die Wurzeln der *mtk* Mutanten reagieren als einzige der untersuchten Genotypen nicht auf Behandlung mit ACC. In den *mtk* Mutanten akkumuliert Methylthioribose (MTR), da die *mtk* Mutanten nicht in der Lage sind MTR zu MTR-Phosphat umzusetzen. Es wäre möglich, dass durch die Akkumulation von MTR die Regulation der MTN-Aktivität durch ACC verhindert wird. Die Reduktion der MTN-Aktivität durch Ethylen könnte auf transkriptionelle Regulation oder auf eine Regulation der MTN-Proteinmenge durch zum Beispiel veränderten Proteinabbau oder eine veränderte Translationsrate zurückzuführen sein. Es wäre auch denkbar, dass die Enzymaktivität direkt reguliert wird.

Aus Reis ist die transkriptionelle Regulation von Enzymen des Methioninzyklus bereits bekannt (Sauter et al., 2004). Es wäre möglich, dass die Promotoren von *MTN1* oder *MTN2* Bindestellen für Ethylen-abhängige Transkriptionsfaktoren enthalten, welche durch Veränderung der Transkriptionsrate zu einer Reduktion von MTN und somit zu einer reduzierten MTN-Aktivität führen. Die Promotoren von *MTN1* und *MTN2* wurden mit PlantPAN auf putative Transkriptionsfaktorbindestellen hin untersucht (Tabelle 5). Es konnten jedoch keine putativen Motive für die Bindung von Ethylen-abhängigen Transkriptionsfaktoren in den untersuchten Promotorbereichen gefunden werden. Das bedeutet, dass *MTN1* und *MTN2* durch keine der von PlantPan untersuchten Ethylen-abhängigen Transkriptionsfaktoren reguliert werden.

Es wäre auch denkbar, dass die Transkripte von *MTN1* und *MTN2* nicht direkt über Ethylen-abhängige Transkriptionsfaktoren reguliert werden, sondern ein weiteres Protein, welches durch Ethylen-abhängige Transkriptionsfaktoren reguliert wird, wiederum die *MTN* Transkripte reguliert (Lingam et al., 2011). Aus diesem Grund wurden zur weiteren Analyse der transkriptionellen Ebene

von *MTN1* und *MTN2* in Arabidopsis Expressionsanalysen durchgeführt. Untersucht wurden die Wurzeln von 14 Tage alten Wildtyppflanzen, die mit oder ohne ACC angezogen wurden (Abb. 19). *MTN1* und *MTN2* zeigten bei Wachstum auf ACC eine leichte aber nicht signifikante Reduktion in der Transkriptmenge im Vergleich zum Wachstum ohne ACC. Die reduzierte Enzymaktivität der MTN in den Wurzeln durch Ethylen ist somit nicht hauptsächlich durch Regulation der Transkriptmengen von *MTN1* oder *MTN2* bedingt. Es wäre allerdings möglich, dass die leicht verringerte Menge an *MTN1* und *MTN2* Transkript durch Ethylen einen Teil zu der reduzierten Enzymaktivität beiträgt.

Weitere Analysen in dieser Arbeit haben gezeigt, dass es sich bei der Regulation der MTN-Aktivität durch Ethylen, um eine langsame Reaktion handelt. Eine Veränderung der MTN-Aktivität konnte nicht innerhalb von Minuten oder wenigen Stunden, wie sie zum Beispiel bei OsMTN eintritt (Rzewuski et al., 2007), beobachtet werden. Bei einer Behandlung mit Ethylen über 8 Stunden kam es zu keiner signifikanten Veränderung in der MTN-Aktivität (Abb. 17). Auch bei einer Behandlung von ein, zwei oder drei Tagen mit ACC zeigten die Wurzeln der behandelten Pflanzen keine signifikante Reduktion der MTN-Aktivität (Abb. 18).

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die reduzierte MTN-Aktivität auf eine verringerte Menge an MTN1 Protein in den Wurzeln der mit Ethylen behandelten Pflanzen zurückzuführen ist (Abb. 20). Veränderungen in der Proteinmenge können zum Beispiel durch eine Veränderung der Proteinstabilität oder durch veränderte Translationsraten hervorgerufen werden. Die Stabilität von Proteinen wird häufig über Ubiquitinierung und den folgenden Abbau über das 26S Proteasom reguliert (Mazzucotelli et al., 2006). Um über den Ubiquitin-Proteasomenweg abgebaut zu werden, müssen die Proteine durch Ubiquitinierung an einem Lysinrest markiert werden. Dazu wird Ubiquitin von einem E1 Enzym gebunden und damit aktiviert. Das aktivierte Ubiquitin wird auf ein Ubiquitin konjugierendes E2 Enzym übertragen und in Anwesenheit einer E3-Ligase auf das Zielprotein übertragen. Die E3-Ligasen, welche in Arabidopsis von über 1000 Genen kodiert werden, erkennen

spezifisch ihre Zielproteine, so dass gerichteter Proteinabbau stattfinden kann (Mazzucotelli et al., 2006).

Eine Regulation durch den Abbau von MTN1 über Ubiquitinierung und anschließende Degradation durch das Proteasom erscheint eher unwahrscheinlich, da eine signifikante Reduktion der MTN-Aktivität und somit der MTN1 Proteinmenge, auch nach drei Tagen Behandlung mit ACC nicht zu erkennen war (Abb. 18). Regulationen, die über Ubiquitinierung und anschließender Degradation der Proteine stattfinden, sind in der Regel schnelle Reaktionen und finden innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden statt (Nishizawa-Yokoi et al., 2010; Smalle und Vierstra, 2004). Zusätzlich konnten in den Primärsequenzen von MTN1 und MTN2 mit der Hilfe der Programme CKSAAP und UbPred, keine eindeutigen putativen Ubiquitinierungsstellen gefunden werden (Abb. 21).

Eine weitere Möglichkeit zur Veränderung der Proteinstabilität ist die SUMOylierung von Proteinen durch SUMO-(*small ubiquitin-like modifier*) Proteine. SUMOylierung weist Ähnlichkeiten mit der Ubiquitinierung von Proteinen auf (Hay, 2005). SUMO-Proteine interagieren, wie die E3-Ligasen zur Ubiquitinierung, mit den Lysinresten ihrer Zielproteine (siehe Seite 92). Die Untersuchung der Primärsequenzen von MTN1 und MTN2 durch Verwendung der Programme SUMOplot und SUMOFI ergab keine eindeutigen SUMOylierungsstellen. Eine Regulation der MTN1 Proteinmengen über Veränderung der Proteine durch die Verknüpfung von MTN mit SUMO-Proteinen scheint eher unwahrscheinlich.

Alleine durch theoretische Vorhersage von Ubiquitinierungsstellen und SUMOylierungsstellen lässt sich eine Veränderung in der Proteinstabilität durch Ethylen nicht vollständig ausschließen, da die Vorhersage der Ubiquitinierungsstellen und SUMOylierungsstellen auf bereits bekannten Motiven, die ubiquitiniert oder SUMOyliert werden können, basiert (Hay, 2005). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit zusätzlich zu den theoretischen Analysen der Primärsequenzen von MTN1 und MTN2, Experimente mit Cycloheximid (CHX) durchgeführt. CHX hemmt die Translation in eukaryotischen Organismen, indem die Elongation der mRNA durch gemeinsame Bindung von CHX und deacylierter tRNA an die rRNA blockiert

wird (Lin und Key, 1968; Schneider-Poetsch et al., 2010). Durch die Inhibierung der Translation können Veränderungen im Proteinabbau untersucht werden. Für MTN1 konnte keine Veränderung in der Geschwindigkeit des Proteinabbaus durch Ethylen beobachtet werden. MTN1 war bis zu 16 Stunden stabil. Es konnte unabhängig von der Behandlung kein Proteinabbau beobachtet werden (Abb. 22). Im Westernblot zeigte sich eine leichte Erhöhung der Proteinmenge in Wurzeln von auf ACC angezogenen und mit CHX behandelten Pflanzen. Es wäre möglich, dass hier eine Regulation stattfindet, die unempfindlich gegenüber CHX ist. Ein erhöhter Proteinabbau scheint somit nicht verantwortlich für die reduzierten MTN1 Proteinmengen in den Wurzeln der mit ACC behandelten Pflanzen. Die zusätzlich zur Analyse der MTN1 Proteinmengen gemessenen MTN-Aktivitäten in den Wurzeln der mit CHX behandelten Pflanzen, bestätigen die Ergebnisse des Westernblots (Abb. 22; Abb. 24). Die MTN-Aktivität in den Wurzeln der auf ACC angezogenen Pflanzen zeigte bei Behandlung mit CHX eine leichte, aber nicht signifikante Erhöhung. Die Messung der MTN-Aktivität bei Behandlung mit CHX bestätigt zudem die hohe Stabilität von MTN1 und der Enzymaktivität von MTN (Abb. 25).

Zusätzlich zur theoretischen Analyse der Proteinsequenzen auf Ubiquitinierung, lässt sich der Proteinabbau durch das Proteasom mit MG132 spezifisch inhibieren. MG132 hemmt reversibel die proteolytische Aktivität der 20S Untereinheit des 26S Proteasoms (Zhang et al., 2011). Behandlung mit MG132 führt in den Wurzeln von Wildtyppflanzen zu einer Akkumulation von MTN1 Protein. Dabei macht die Anwesenheit von Ethylen keinen Unterschied (Abb. 26). Über das Proteasom werden auch Proteine abgebaut, die nicht richtig gefaltet oder anderweitig beschädigt sind (Kurepa et al., 2010). Es wäre denkbar, dass die erhöhte Proteinmenge in den Wurzeln der mit MG132 behandelten Pflanzen durch ein Zusammenspiel der hohen Stabilität von MTN1, der nicht mehr abgebauten inaktiven MTN1 Proteine und der weiter stattfindenden Translation hervorgerufen wird. Dafür würde auch die trotz der erhöhten Proteinmengen nicht signifikant veränderte MTN-Aktivität in den Wurzeln der mit MG132 behandelten Pflanzen sprechen (Abb. 27).

Zur weiteren Untersuchung der Regulation der MTN-Aktivität über Ethylen wurden neben dem Wildtyp auch *ein2*, *eto3* und *ctr1* Pflanzen

analysiert. Bei Anzucht auf Sulfat zeigten die *eto3* Mutante und die *ctr1* Mutante ein reduziertes Wachstum (Abb. 28), welches auf eine induzierte Ethylenantwort zurückzuführen ist (Kieber et al. 1993). Bei Anzucht auf MTA zeigten alle untersuchten Genotypen eine Reduktion des Wachstums.

Durch 1-MCP konnten sowohl das Wachstum, als auch die Reduktion der MTN-Aktivität der *eto3* Mutante zurück auf Wildtyplevel gebracht werden (Abb. 28, Abb. 29). 1-MCP war jedoch nicht in der Lage, das Wachstum der *eto3* Mutante vollständig zu komplementieren, wenn diese auf MTA angezogen wurden. Diese unvollständige Komplementierung könnte auf das Zusammenspiel von MTA und der erhöhten Menge an MTA durch die Stabilisierung von ACS9 in der *eto3* Mutante zurückzuführen sein. Da die *ctr1* Mutante eine generelle, von der Behandlung mit 1-MCP unabhängige Reduktion der MTN-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp zeigten (Abb. 29), ist anzunehmen, dass die Reduktion der MTN-Aktivität über die Ethylenantwort und nicht über die Ethylenproduktion reguliert ist.

Es wäre möglich, dass die veränderte Menge an MTN1 und somit die geringere MTN-Aktivität durch Ethylen reduzierte Wurzelwachstum zurückzuführen ist. In diesem Fall wäre auch eine signifikante Reduktion der *MTN1* Transkriptmenge zu erwarten. Eine solche Reduktion konnte für MTN1 nicht gezeigt werden (Abb. 17). Zusätzlich müsste die MTN-Aktivität im Spross durch Ethylen in diesem Fall ebenfalls reduziert sein, da auch das Sprosswachstum bei erhöhter Ethylenproduktion reduziert ist (Kieber et al. 1993). Die MTN-Aktivität im Spross war durch Ethylen nicht reduziert (Abb. 30). Die Reduktion der MTN1 Proteinmenge durch eine Verschiebung des Verhältnisses MTN1/Gesamtprotein durch das reduzierte Wurzelwachstum scheint somit unwahrscheinlich.

Die Reduktion der MTN-Aktivität durch Ethylen findet über Regulation durch die Ethylenantwort statt. Diese Regulation führt zur Reduktion der MTN1 Proteinmenge, wodurch die MTN-Aktivität reduziert ist. Verringerte Transkription spielt bei der Reduktion der MTN1 Proteinmenge nur eine geringe Rolle. Eine weitere Möglichkeit der Regulation wäre eine direkte Interaktion von MTN1 mit anderen Proteinen. Diese Proteine könnten durch die Ethylenantwort reguliert sein und so zu einer Reduktion der MTN1 Proteinmenge führen.

In dieser Arbeit wurde eine Ethylen-induzierte Reduktion der MTN-Enzymaktivität in 14 Tage alten Wurzeln beobachtet. Bereits beschrieben ist die Hemmung der MTA-Nukleosidase durch Interaktion mit CALCINEURIN-B-LIKE 3 (CBL3) in Anwesenheit von Kalzium (Oh et al., 2008). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Reduktion der MTN-Aktivität durch Ethylen über die Kalzium-abhängige Interaktion mit CBL3 vermittelt werden könnte.

Zu erkennen war, dass die Zugabe von Kalzium in Form von Kalziumchlorid unabhängig vom verwendeten Medium zu einer signifikanten Reduktion der MTN-Aktivität in Extrakten aus Wurzeln von Arabidopsis führte (Abb. 30). Die Reduktion der MTN-Aktivität durch Ethylen konnte nicht mit der Zugabe von Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) komplementiert werden. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die Reduktion der MTN-Aktivität durch Ethylen über Kalzium-abhängige Interaktion mit CBL3 reguliert wird. Die Behandlung mit EGTA führte immer zu einem leichten, aber nicht signifikanten Anstieg der MTN-Aktivität. Es wäre denkbar, dass eine geringe Hemmung über Kalzium-abhängige Interaktion mit CBL3 ständig in Arabidopsis stattfindet. Die reduzierte MTN-Aktivität könnte auch auf das Chlorid im verwendeten Kalziumchlorid zurückzuführen sein. Diese Hypothese wurde bereits durch Oh et al. (2008) widerlegt. Zugabe von CaCl_2 ohne die Zugabe von CBL3 zum MTN1 Protein hatte keine Auswirkungen auf die MTN-Aktivität.

Die in dieser Arbeit verwendete Kalziumkonzentration von 1 mM lag weit über der Konzentration von 100 bis 200 nM Kalzium im Zytosol. Bei einer Kalziumkonzentration von 100 μM konnte eine leichte, aber nicht signifikante Reduktion der MTN-Aktivität beobachtet werden (Abb. 31). Bei einer Konzentration von 500 μM Kalzium war die Reduktion der MTN-Aktivität signifikant. Kalziumionen haben im Zytosol eine geringere Diffusionsrate als in wässriger Lösung, wodurch es zu einer lokalen Akkumulation von Kalziumionen im Zytosol kommen kann. Diese Akkumulation kann eine lokale Konzentration von 100 μM übersteigen und wird von der Zelle für verschiedene Kalzium-abhängige Reaktionen genutzt (Sanders et al., 1999; Malhò et al., 1998). Es ist somit möglich, dass durch die lokalen Akkumulationen von Kalziumionen eine Konzentration erreicht wird, bei der es zu einer signifikanten Inhibierung der

MTN-Aktivität kommen kann. Die Pflanzen hätten somit die Möglichkeit einer schnellen, kurzzeitigen Regulation der MTA-Nukleosidase über eine lokale Veränderung des intrazellulären Kalziumgehaltes.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die MTN-Aktivität zum Einen durch Ethylen über eine Reduktion der MTN1 Proteinmenge reguliert werden kann. Zum Anderen ist es möglich, die MTN-Aktivität direkt über Kalzium-abhängige Regulation zu reduzieren. Der Mechanismus der Kalzium-abhängigen Reduktion der MTN-Aktivität wurde bereits von Oh et al. (2008) beschrieben. Die Reduktion der MTN1 Proteinmenge durch Ethylen konnte auf eine Regulation über den Ethylensignalweg zurückgeführt werden. Es handelt sich dabei weder um eine Regulation der Transkription, noch ist der Proteinabbau bei Behandlung mit Ethylen erhöht. Da MTN1 in der Lage ist, sowohl mit CBL3 als auch mit CBL2 zu interagieren (Arabidopsis Interactome Mapping Consortium, 2011; Oh et al., 2008), wäre es denkbar, dass die Ethylen-vermittelte Reduktion der MTN1 Proteinmenge durch einen weiteren Interaktionspartner reguliert wird. Zur Überprüfung dieser Hypothese könnte versucht werden mit MTN1 als Bindungspartner weitere Interaktionspartner zu isolieren.

LITERATURVERZEICHNIS

Abel S, Nguyen MD, Chow W, Theologis A (1995) ACS4, a primary indoleacetic acid-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis thaliana*. Structural characterization, expression in *Escherichia coli*, and expression characteristics in response to auxin [corrected]. J Biol Chem 270:19093-19099.

Acaster MA, Kende H (1983) Properties and partial purification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. Plant Physiol 72(1):139-145.

Adams DO, Yang SF (1977) Methionine metabolism in apple tissue: Implication of S-adenosylmethionine as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. Plant Physiol 60:892-896.

Albers E (2009) Metabolic characteristics and importance of the universal methionine salvage pathway recycling methionine from 5'-methylthioadenosine. Life 61(12):1132-1142.

Alcázar R, Altabella T, Marco F, Bortolotti C, Reymond M, Koncz C, Carrasco P, Tiburcio AF (2010) Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. Planta 231(6):1237-1249.

Alexander L, Grierson D (2002) Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. J Exp Bot 53(377):2039-2055.

Alonso JM, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S, Ecker JR (1999) EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. Science 284(5423):2148-2152.

Alonso JM, Stepanova AN, Solano R, Wisman E, Ferrari S, Ausubel FM, Ecker JR (2003) Five components of the ethylene-response pathway identified in a screen for weak ethylene-insensitive mutants in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci USA 100(5):2992-2997.

Arabidopsis Interactome Mapping Consortium (2011) Evidence for network evolution in an Arabidopsis interactome map. Science 333(6042):601-607.

Bagni N (1966) Aliphatic amines and a growth-factor of coconut milk as stimulating cellular proliferation of *Helianthus tuberosus* (Jerusalem artichoke) in vitro. *Experientia* 22(11):732-733.

Bagni N, Tassoni A (2001) Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* 20(3):301-317.

Barry CS, Blume B, Bouzayen M, Cooper W, Hamilton AJ, Grierson D (1996) Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. *Plant J* 9:525-535.

Barry CS, Llop-Tous MI, Grierson D (2000) The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. *Plant Physiol* 123(3):979-986.

Baur AH, Yang SF (1969) Precursors of ethylene. *Plant Physiol* 44(9):1347-9.

Baur AH, Yang SF (1972) Methionine metabolism in apple tissue in relation to ethylene biosynthesis. *Phytochemistry* 11:3207-3214.

Bidonde S, Ferrer MA, Zegzouti H, Ramassamy S, Latché A, Pech JC, Hamilton AJ, Grierson D, Bouzayen M (1998) Expression and characterization of three tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase cDNAs in yeast. *Eur J Biochem* 253(1):20-26.

Blankenship SM, Dole JM (2003) 1-Methylcyclopropene: a review. *Post Harvest Biol Tech* 28:1-25.

Bleecker AB, Estelle MA, Somerville C, Kende H (1988) Insensitivity to Ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 241(4869):1086-1089.

Bleecker AB (1999) Ethylene perception and signaling: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci* 4(7):269-274.

Boller T, Herner RC, Kende H (1979) Assay for and enzymatic formation of an ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Planta* 145: 293-303.

Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci* 140(2):103-125.

Bourgis F, Roje S, Nuccio ML, Fisher DB, Tarczynski MC, Li C, Herschbach C, Rennenberg H, Pimenta MJ, Shen TL, Gage DA, Hanson AD (1999) S-methylmethionine plays a major role in phloem sulfur transport and is synthesized by a novel type of methyltransferase. *Plant Cell* 11(8):1485-1498.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

Bürstenbinder K, Rzewuski G, Wirtz M, Hell R, Sauter M (2007) The role of methionine recycling for ethylene synthesis in Arabidopsis. *Plant J* 49:238-249.

Bürstenbinder K, Waduware I, Schoor S, Moffatt BA, Wirtz M, Minocha SC, Oppermann Y, Bouchereau A, Hell R, Sauter M (2010) Inhibition of 5'-methylthioadenosine metabolism in the Yang cycle alters polyamine levels, and impairs seedling growth and reproduction in Arabidopsis. *Plant J* 62(6):977-988.

Chae HS, Faure F, Kieber JJ (2003) The *eto1*, *eto2*, and *eto3* mutations and cytokinin treatment increase ethylene biosynthesis in Arabidopsis by increasing the stability of ACS protein. *Plant Cell* 15(2):545-559.

Chao Q, Rothenberg M, Solano R, Roman G, Terzaghi W, Ecker JR (1997) Activation of the ethylene gas response pathway in Arabidopsis by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* 89(7):1133-1144.

Chen H, Cheng H, Bjerknes M (1993) One-step Coomassie brilliant blue R-250 staining of proteins in polyacrylamide gel. *Anal Biochem* 212(1):295-296.

Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP (1996) S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J* 10(4):471-480.

Chiba Y, Ishikawa M, Kijima F, Tyson RH, Kim J, Yamamoto A, Nambara E, Leustek T, Wallsgrove RM, Naito S (1999) Evidence for autoregulation of cystathionine gamma-synthase mRNA stability in Arabidopsis. *Science* 286(5443):1371-1374.

Christians MJ, Gingerich DJ, Hansen M, Binder BM, Kieber JJ, Vierstra RD (2009) The BTB ubiquitin ligases ETO1, EOL1 and EOL2 act collectively to regulate ethylene biosynthesis in Arabidopsis by controlling type-2 ACC synthase levels. *Plant J* 57:332-345.

Chung MC, Chou SJ, Kuang LY, Charng YY, Yang SF (2002) Subcellular localization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase in apple fruit. *Plant Cell Physiol* 43(5):549-554.

Clark KL, Larsen PB, Wang X, Chang C (1998) Association of the Arabidopsis CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(9):5401-5406.

Clay NK, Nelson T (2005) Arabidopsis thickvein mutation affects vein thickness and organ vascularization, and resides in a provascular cell-specific spermine synthase involved in vein definition and in polar auxin transport. *Plant Physiol* 138:767-777.

Cornell KA, Winter RW, Tower PA, Riscoe MK (1996) Affinity purification of 5-methylthioribose kinase and 5-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase from *Klebsiella pneumoniae* [corrected]. *Biochem J* 317(Pt1):285-290.

Crocker W, Knight LI (1908) Effect of Illuminating Gas and Ethylene upon Flowering Carnations. *Bot. Gaz* 46:259-276.

Curien G, Dumas R, Ravanel S, Douce R (1996) Characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding an S-adenosylmethionine-sensitive threonine synthase. Threonine synthase from higher plants. FEBS Lett 390(1):85-90.

Curien G, Job D, Douce R, Dumas R (1998) Allosteric activation of Arabidopsis threonine synthase by S-adenosylmethionine. Biochem 37(38):13212-13221.

Donnelly PM, Bonetta D, Tsukaya H, Dengler RE, Dengler NG (1999) Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of Arabidopsis. Dev Biol 215(2):407-419.

Dong JG, Fernández-Maculeit JC, Yang SF (1992) Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from apple fruit. Proc Natl Acad Sci USA 89(20):9789-9793.

Droux M (2004) Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey. Photosynth Res 79(3):331-348.

Eckermann C, Eichel J, Schröder J (2000) Plant methionine synthase: new insights into properties and expression. Biol Chem 381(8):695-703.

Evans PT, Malmberg RL (1989) Do Polyamines Have Roles in Plant Development? Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 40:235-269.

Ferreira P, Hemerly A, de Almeida Engler J, Bergounioux C, Burssens S, Van Montagu M, Engler G, Inzé D (1994) Three discrete classes of Arabidopsis cyclins are expressed during different intervals of the cell cycle. Proc Natl Acad Sci USA 91(24):11313-11317.

Flores HE, Galston AW (1982) Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. Plant Physiol 69(3):701-706.

Flores T, Todd CD, Tovar-Mendez A, Dhanoa PK, Correa-Aragunde N, Hoyos ME, Brownfield DM, Mullen RT, Lamattina L, Polacco JC (2008) Arginase-negative mutants of Arabidopsis exhibit increased nitric oxide signaling in root development. *Plant Physiol* 147(4):1936-1946.

Flügge UI, Fischer K, Gross A, Sebald W, Lottspeich F, Eckerskorn C (1989) The triose phosphate-3-phosphoglycerate-phosphate translocator from spinach chloroplasts: nucleotide sequence of a full-length cDNA clone and import of the in vitro synthesized precursor protein into chloroplasts. *EMBO J* 8(1):39-46.

Fontecave M, Atta M, Mulliez E (2004) S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends Biochem Sci* 29(5):243-249.

Franceschetti M, Hanfrey C, Scaramagli S, Torrigiani P, Bagni N, Burtin D, Michael AJ (2001) Characterization of monocot and dicot plant S-adenosyl-methionine decarboxylase gene families including identification in the mRNA of a highly conserved pair of upstream overlapping open reading frames. *Biochem J* 353(Pt2):403-409.

Friml J, Wisniewska J, Benková E, Mendgen K, Palme K (2002) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature* 415:806-809.

Gagne JM, Smalle J, Gingerich DJ, Walker JM, Yoo SD, Yanagisawa S, Vierstra RD (2004) Arabidopsis EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(17):6803-6808.

Galston AW, Sawhney RK (1990) Polyamines in plant physiology. *Plant Physiol* 94(2):406-410.

Ge C, Cui X, Wang Y, Hu Y, Fu Z, Zhang D, Cheng Z, Li J (2006) BUD2, encoding an S-adenosylmethionine decarboxylase, is required for Arabidopsis growth and development. *Cell Res* 16(5):446-456.

Giovanelli J, Mudd SH, Datko AH (1985) Quantitative analysis of pathways of methionine metabolism and their regulation in *Lemna*. Plant Physiol 78(3):555-560.

Gophna U, Bapteste E, Doolittle WF, Biran D, Ron EZ (2005) Evolutionary plasticity of methionine biosynthesis. Gene 355:48-57.

Grossman A, Takahashi H (2001) Macronutrient utilization by photosynthetic eukaryotes and the fabric of interactions. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 52:163-210.

Guo H, Ecker JR (2003) Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. Cell 115(6):667-677.

Guzmán P, Ecker JR (1990) Exploiting the triple response of Arabidopsis to identify ethylene-related mutants. Plant Cell 2(6):513-523.

Hamasaki N, Galston AW (1990) The polyamines of *Xanthium strumarium* and their response to photoperiod. Photochem Photobiol 52(1):181-186.

Hamilton AJ, Bouzayen M, Grierson D (1991) Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. Proc Natl Acad Sci USA 88(16):7434-7437.

Hanfrey C, Sommer S, Mayer MJ, Burtin D, Michael AJ (2001) Arabidopsis polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. Plant J 27(6):551-560.

Hanzawa Y, Takahashi T, Komeda Y (1997) ACL5: an Arabidopsis gene required for internodal elongation after flowering. Plant J 12(4):863-874.

Hanzawa Y, Takahashi T, Michael AJ, Burtin D, Long D, Pineiro M, Coupland G, Komeda Y (2000) ACAULIS5, an Arabidopsis gene required for stem elongation, encodes a spermine synthase. EMBO J 19(16):4248-4256.

Hanzawa Y, Imai A, Michael AJ, Komeda Y, Takahashi T (2002) Characterization of the spermidine synthase-related gene family in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett 527(1-3):176-180.

Hay RT (2005) SUMO: a history of modification. Mol Cell 18(1):1-12.

Heby O (1981) Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. Differentiation 19(1):1-20.

Hemerly A, Bergounioux C, Van Montagu M, Inzé D, Ferreira P (1992) Genes regulating the plant cell cycle: isolation of a mitotic-like cyclin from *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA 89(8):3295-3299.

Herbik A, Koch G, Mock HP, Dushkov D, Czihal A, Thielmann J, Stephan UW, Bäumlein H (1999) Isolation, characterization and cDNA cloning of nicotianamine synthase from barley. A key enzyme for iron homeostasis in plants. Eur J Biochem 265(1):231-239.

Hesse H, Hoefgen R (2003) Molecular aspects of methionine biosynthesis. Trends Plant Sci 8(6):259-262.

Hesse H, Kreft O, Maimann S, Zeh M, Hoefgen R (2004) Current understanding of the regulation of methionine biosynthesis in plants. J Exp Bot 55(404):1799-1808.

Hibasami H, Tanaka M, Nagai J, Ikeda T (1980) Dicyclohexylamine, a potent inhibitor of spermidine synthase in mammalian cells. FEBS Lett 116(1):99-101.

Hirano H, Shinmyo A, Sekine M (2011) Arabidopsis G1 cell cycle proteins undergo proteasome-dependent degradation during sucrose starvation. Plant Physiol Biochem 49(6):687-691.

Hoffman NE, Yang SF, McKeon T (1982) Identification of 1-(malonylamino) cyclopropane-1-carboxylic acid as a major conjugate of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, an ethylene precursor in higher plants. Biochem Biophys Res Commun 104(2):765-770.

Igarashi K, Kashiwagi K (2000) Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* 271(3):559-564.

Imai A, Matsuyama T, Hanzawa Y, Akiyama T, Tamaoki M, Saji H, Shirano Y, Kato T, Hayashi H, Shibata D, Tabata S, Komeda Y, Takahashi T (2004a) Spermidine synthase genes are essential for survival of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 135(3):1565-1573.

Imai A, Akiyama T, Kato T, Sato S, Tabata S, Yamamoto KT, Takahashi T (2004b) Spermine is not essential for survival of *Arabidopsis* *FEBS Lett* 556(1-3):148-152.

Ivanchenko MG, Muday GK, Dubrovsky JG (2008) Ethylene- auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 55(2):335-347.

Janowitz T, Kneifel H, Piotrowski M (2003) Identification and characterization of plant agmatine iminohydrolase, the last missing link in polyamine biosynthesis of plants. *FEBS Lett* 544(1-3):258-261.

Jiao XZ, Philosoph-Hadas S, Su LY, Yang SF (1986) The conversion of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid to 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in plant tissues. *Plant Physiol* 81(2):637-641.

Joo S, Liu Y, Lueth A, Zhang S (2008) MAPK phosphorylation-induced stabilization of ACS6 protein is mediated by the non-catalytic C-terminal domain, which also contains the cis-determinant for rapid degradation by the 26S proteasome pathway. *Plant J* 54(1):129-140.

Takehi J, Kuwashiro Y, Niitsu M, Takahashi T (2008) Thermospermine is required for stem elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 49:1342-1349.

Kamiyoshihara Y, Iwata M, Fukaya T, Tatsuki M, Mori H (2010) Turnover of LeACS2, a wound-inducible 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase in tomato, is regulated by phosphorylation/dephosphorylation. *Plant J* 64(1):140-150.

Kaur-Sawhney R, Tiburcio AF, Galston AW (1988) Spermidine and flower-bud differentiation in thin-layer explants of tobacco. *Planta* 173:282-284.

Kende H, Zeevaart J (1997) The Five "Classical" Plant Hormones. *Plant Cell* 9(7):1197-1210.

Kieber J (1997) The ethylene signal transduction pathway in Arabidopsis. *J Exp Bot* 48(307): 211-218.

Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* 72(3):427-441.

Kloor D, Fuchs S, Petroktistis F, Delabar U, Mühlbauer B, Quast U, Osswald H (1998) Effects of ions on adenosine binding and enzyme activity of purified S-adenosylhomocysteine hydrolase from bovine kidney. *Biochem Pharmacol* 56(11):1493-1496.

Kloor D, Osswald H (2004) S-Adenosylhomocysteine hydrolase as a target for intracellular adenosine action. *Trends Pharmacol Sci* 25(6):294-297.

Kocsis MG, Ranocha P, Gage DA, Simon ES, Rhodes D, Peel GJ, Mellema S, Saito K, Awazuhara M, Li C, Meeley RB, Tarczynski MC, Wagner C, Hanson AD (2003) Insertional inactivation of the methionine S-methyltransferase gene eliminates the S-methylmethionine cycle and increases the methylation ratio. *Plant Physiol* 131(4):1808-1815.

Kopriva S (2006) Regulation of sulfate assimilation in Arabidopsis and beyond. *Ann Bot* 97(4):479-495.

Kreft O, Hoefgen R, Hesse H (2003) Functional analysis of cystathionine gamma-synthase in genetically engineered potato plants. *Plant Physiol* 131(4):1843-1854.

Kumar A, Taylor M, Mad Arif SA, Davies H (1996) Potato plants expressing antisense and sense S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) transgenes show altered levels of polyamines and ethylene: antisense plants display abnormal phenotypes. *Plant J* 9:147-158.

Kumar A, Taylor M, Altabella T, Tiburcio AF (1997) Recent advances in polyamine research. *Trends Plant Sci* 2(4):124-130.

Kurepa J, Karangwa C, Duke LS, Smalle JA (2010) Arabidopsis sensitivity to protein synthesis inhibitors depends on 26S proteasome activity. *Plant Cell Rep* 29(3):249-259.

Kurihara Y, Matsui A, Hanada K, Kawashima M, Ishida J, Morosawa T, Tanaka M, Kaminuma E, Mochizuki Y, Matsushima A, Toyoda T, Shinozaki K, Seki M (2009) Genome-wide suppression of aberrant mRNA-like noncoding RNAs by NMD in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(7):2453-2458.

Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y (2008) Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* 228(3):367-381.

Kushad MM, Richardson DG, Ferro AJ (1983) Intermediates in the recycling of 5-methylthioribose to methionine in fruits. *Plant Physiol* 73(2):257-261.

Kushad MM, Richardson DG, Ferro AJ (1985) 5'-methylthioadenosine nucleosidase and 5-methylthioribose kinase activities and ethylene production during tomato fruit development and ripening. *Plant Physiol* 79(2):525-529.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685.

Lee JE, Luong W, Huang DJ, Cornell KA, Riscoe MK, Howell PL (2005) Mutational analysis of a nucleosidase involved in quorum-sensing autoinducer-2 biosynthesis. *Biochemistry* 44(33):11049-11057.

Leustek T, Martin MN, Bick JA, Davies JP (2000) Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:141-165.

Liang X, Oono Y, Shen NF, Köhler C, Li K, Scolnik PA, Theologis A (1995) Characterization of two members (ACS1 and ACS3) of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 167(1-2):17-24.

Lin LC, Hsu JH, Wang LC (2010) Identification of novel inhibitors of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by chemical screening in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 285(43):33445-33456.

Lin Y, Key JL (1968) Cell elongation in the soybean root: The influence of inhibitors of RNA and protein biosynthesis. *Plant Cell Physiol* 9(3):553-560.

Lin Z, Hong Y, Yin M, Li C, Zhang K, Grierson D (2008) A tomato HD-Zip homeobox protein, LeHB-1, plays an important role in floral organogenesis and ripening. *Plant J* 55(2):301-310.

Lin Z, Zhong S, Grierson D (2009) Recent advances in ethylene research. *J Exp Bot* 60(12):3311-3336.

Lingam S, Mohrbacher J, Brumbarova T, Potuschak T, Fink-Straube C, Blondet E, Genschik P, Bauer P (2011) Interaction between the bHLH transcription factor FIT and ETHYLENE INSENSITIVE3/ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 reveals molecular linkage between the regulation of iron acquisition and ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23(5):1815-1829.

Liu JH, Kitashiba H, Wang J, Ban Y, Moriguchi T (2007) Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. *Plant Biotech* 24(1):117-126.

Liu U, Hoffmann NE, Yang SF (1983) Relationship between the malonylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and D-amino acids in mung-bean hypocotyls. *Planta* 153:437-441.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4):402-408.

Ljung K, Bhalerao RP, Sandberg G (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth. *Plant J* 28:465-474.

Luo J, Fuell C, Parr A, Hill L, Bailey P, Elliott K, Fairhurst SA, Martin C, Michael AJ (2009) A novel polyamine acyltransferase responsible for the accumulation of spermidine conjugates in Arabidopsis seed. *Plant Cell* 21(1):318-333.

Malhò R, Moutinho A, Van Der Luit A, Trewavas AJ (1998) Spatial characteristics of calcium signaling: the calcium wave as a basic unit in plant cell calcium signaling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353(1374):1463-1473.

Marchant A, Bhalerao R, Casimiro I, Eklöf J, Casero PJ, Bennett M, Sandberg G (2002) AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the Arabidopsis seedling. *Plant Cell* 14(3):589-597.

Mattsson J, Sung ZR, Berleth T (1999) Responses of plant vascular systems to auxin transport inhibition. *Development* 126(13):2979-2991.

Mazzucotelli E, Belloni S, Marone D, De Leonardis AM, Guerra D, Di Fonzo N, Cattivelli L, Mastrangelo AM (2006) The E3 Ubiquitin Ligase Gene Family in Plants: Regulation by Degradation. *Curr Gen* 7(8):509-522.

McMurchie EJ, McGlasson WB, Eaks IL (1972) Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene. *Nature* 237(5352):235-236.

Miyazaki JH, Yang SF (1987) Inhibition of the Methionine Cycle Enzymes. *Phytochemistry* 26(10):2655-2660.

Morgan DM (1998) Determination of polyamines as their benzoylated derivatives by HPLC. *Methods Mol Biol* 79:111-118.

Moschou PN, Sanmartin M, Andriopoulou AH, Rojo E, Sanchez-Serrano JJ, Roubelakis-Angelakis KA (2008) Bridging the gap between plant and mammalian polyamine catabolism: a novel peroxisomal polyamine oxidase responsible for a full back-conversion pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol* 147(4):1845-1857.

Moschou PN, Paschalidis KA, Roubelakis-Angelakis KA (2008b) Plant polyamine catabolism: The state of the art. *Plant Signal Behav* 3(12):1061-1066.

Møller SG, McPherson MJ (1998) Developmental expression and biochemical analysis of the Arabidopsis atao1 gene encoding an H₂O₂-generating diamine oxidase. *Plant J* 13(6):781-791.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.

Nakatsuka A, Murachi S, Okunishi H, Shiomi S, Nakano R, Kubo Y, Inaba A (1998) Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiol* 118(4):1295-1305.

Neljubov D (1901) Über die horizontale Nutation der Stengel von *Pisum sativum* und einiger Anderer Pflanzen. *Beih Bot Zentralb* 10:128-139.

Nishizawa-Yokoi A, Tainaka H, Yoshida E, Tamoi M, Yabuta Y, Shigeoka S (2010) The 26S proteasome function and Hsp90 activity involved in the regulation of HsfA2 expression in response to oxidative stress. *Plant Cell Physiol* 51(3):486-496.

O'Malley RC, Rodriguez FI, Esch JJ, Binder BM, O'Donnell P, Klee HJ, Bleeker AB (2005) Ethylene-binding activity, gene expression levels, and receptor system output for ethylene receptor family members from Arabidopsis and tomato. *Plant J* 41(5):651-659.

O'Neill SD (1997) Pollination regulation of flower development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:547-574.

Oh SI, Park J, Yoon S, Kim Y, Park S, Ryu M, Nam MJ, Ok SH, Kim JK, Shin JS, Kim KN (2008) The Arabidopsis calcium sensor calcineurin B-like 3 inhibits the 5'-methylthioadenosine nucleosidase in a calcium-dependent manner. *Plant Physiol* 148(4):1883-1896.

Onouchi H, Lambein I, Sakurai R, Suzuki A, Chiba Y, Naito S (2004) Autoregulation of the gene for cystathionine gamma-synthase in Arabidopsis: post-transcriptional regulation induced by S-adenosylmethionine. *Biochem Soc Trans* 32(Pt4):597-600.

Panicot M, Minguet EG, Ferrando A, Alcázar R, Blázquez MA, Carbonell J, Altabella T, Koncz C, Tiburcio AF (2002) A polyamine metabolon involving aminopropyl transferase complexes in Arabidopsis. *Plant Cell* 14(10):2539-2551.

Pegg AE, Borchardt RT, Coward JK (1981) Effects of inhibitors of spermidine and spermine synthesis on polyamine concentrations and growth of transformed mouse fibroblasts. *Biochem J* 194(1):79-89.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9):e45.

Piotrowski M, Janowitz T, Kneifel H (2003) Plant C-N hydrolases and the identification of a plant N-carbamoylputrescine amidohydrolase involved in polyamine biosynthesis. *J Biol Chem* 278(3):1708-1712.

Pommerrenig B, Feussner K, Zierer W, Rabinovych V, Klebl F, Feussner I, Sauer N (2011) Phloem-specific expression of Yang cycle genes and identification of novel Yang cycle enzymes in *Plantago* and *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23(5):1904-1919.

Potuschak T, Lechner E, Parmentier Y, Yanagisawa S, Grava S, Koncz C, Genschik P (2003) EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two *arabidopsis* F box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell* 115(6):679-689.

Qiao H, Chang KN, Yazaki J, Ecker JR (2009) Interplay between ethylene, ETP1/ETP2 F-box proteins, and degradation of EIN2 triggers ethylene responses in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 23(4):512-521.

Ranocha P, McNeil SD, Ziemak MJ, Li C, Tarczynski MC, Hanson AD (2001) The S-methylmethionine cycle in angiosperms: ubiquity, antiquity and activity. *Plant J* (5):575-584.

Ravanel S, Gakière B, Job D, Douce R (1998) The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(13):7805-7812.

Reinhardt D, Kende H, Boller T (1994) Subcellular localization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase in tomato cells. *Planta* 195(1):142-146.

Rocklin AM, Kato K, Liu HW, Que L Jr, Lipscomb JD (2004) Mechanistic studies of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase: single turnover reaction. *J Biol Inorg Chem* 9(2):171-182.

Rzewuski G, Cornell KA, Rooney L, Bürstenbinder K, Wirtz M, Hell R, Sauter M (2007) OsMTN encodes a 5'-methylthioadenosine nucleosidase that is up-regulated during submergence-induced ethylene synthesis in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot* 58(6):1505-1514.

Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P, Scheres B (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell* 99(5):463-472.

Saito K (2024) Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road. *Plant Physiol* 136(1):2443-2450.

Saftner RA, Baldi BG (1990) Polyamine levels and tomato fruit development: possible interaction with ethylene. *Plant Physiol* 92(2):547-550.

Sanders D, Brownlee C, Harper JF (1999) Communicating with calcium *Plant Cell* 11(4):691-706.

Sauter M, Cornell KA, Beszteri S, Rzewuski G (2004) Functional analysis of methylthioribose kinase genes in plants. *Plant Physiol* 136(4):4061-4071.

Sauter M, Lorbiecke R, Ouyang B, Pochapsky TC, Rzewuski G (2005) The immediate-early ethylene response gene OsARD1 encodes an acireductone dioxygenase involved in recycling of the ethylene precursor S-adenosylmethionine. *Plant J* 44(5):718-729.

Schaller GE, Bleecker AB (1995) Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the Arabidopsis ETR1 gene. *Science* 270(5243):1809-1811.

Schaller GE, Kieber JJ (2002) Ethylene. *Arabidopsis Book*.

Schlenk F (1983) Methylthioadenosine. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 54:195-265.

Schneider-Poetsch T, Ju J, Eyler DE, Dang Y, Bhat S, Merrick WC, Green R, Shen B, Liu JO (2010) Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat Chem Biol* 6(3):209-217.

Schofield CJ, Zhang Z (1999) Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes. *Curr Opin Struct Biol* 9(6):722-731.

Sebela M, Radová A, Angelini R, Tavladoraki P, Frébort I, Pec P (2001) FAD-containing polyamine oxidases: a timely challenge for researchers in biochemistry and physiology of plants. *Plant Sci* 160(2):197-207.

Sekowska A, Danchin A (2002) The methionine salvage pathway in *Bacillus subtilis*. *BMC Microbiol* 25:2-8.

Sisler EC (2006) The discovery and development of compounds counteracting ethylene at the receptor level. *Biotechnol Adv* 24(4):357-367.

Smalle J, Vierstra RD (2004) The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol* 55:555-590.

Smith FW, Hawkesford MJ, Prosser IM, Clarkson DT (1995) Isolation of a cDNA from *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a high affinity sulphate transporter at the plasma membrane. *Mol Gen Genet* 247(6):709-715.

Solano R, Stepanova A, Chao Q, Ecker JR (1998) Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes Dev* 12(23):3703-3714.

Steel LF and Jacobson A (1987) Translational control of ribosomal protein synthesis during early *Dictyostelium discoideum* development. *Mol Cell Biol* 7(3): 965–972.

Swarup R, Perry P, Hagenbeek D, Van Der Straeten D, Beemster GT, Sandberg G, Bhalerao R, Ljung K, Bennett MJ (2007) Ethylene upregulates auxin biosynthesis in Arabidopsis seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. *Plant Cell* 19(7):2186-2196.

Tabor CW, Tabor H (1984) Polyamines. *Annu Rev Biochem* 53:749-790.

Tabor CW, Tabor H (1995) Polyamines in microorganisms. *Microbiol Rev* 49(1):81-99.

Tabor CW, Tabor H (1999) It all started on a streetcar in Boston. *Annu Rev Biochem* 68:1-32.

Takahashi H, Asanuma W, Saito K (1999) Cloning of an Arabidopsis cDNA encoding a chloroplast localizing sulphate transporter isoform. J Exp Bot 50(340):1713-1714.

Tamura H, Saito Y, Ashida H, Inoue T, Kai Y, Yokota A, Matsumura H (2008) Crystal structure of 5-methylthioribose 1-phosphate isomerase product complex from *Bacillus subtilis*: implications for catalytic mechanism. Prot Sci 17(1):126-135.

Tassoni A, Watkins CB, Davies PJ (2006) Inhibition of the ethylene response by 1-MCP in tomato suggests that polyamines are not involved in delaying ripening, but may moderate the rate of ripening or over-ripening. J Exp Bot 57(12):3313-3325.

Tatsuki M, Mori H (2001) Phosphorylation of tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, LE-ACS2, at the C-terminal region. J Biol Chem 276(30):28051-28057.

Tavladoraki P, Rossi MN, Saccuti G, Perez-Amador MA, Polticelli F, Angelini R, Federico R (2006) Heterologous expression and biochemical characterization of a polyamine oxidase from Arabidopsis involved in polyamine back conversion. Plant Physiol 141(4):1519-1532.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Biotech 24:145-149.

Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. Plant Cell 9:1963-1971.

Urano K, Hobo T, Shinozaki K (2005) Arabidopsis ADC genes involved in polyamine biosynthesis are essential for seed development. FEBS Lett 579(6):1557-1564.

Van de Poel B, Bulens I, Markoula A, Hertog ML, Dreesen R, Wirtz M, Vandoninck S, Oppermann Y, Keulemans J, Hell R, Waelkens E, De Proft MP, Sauter M, Nicolai BM, Geeraerd AH (2012) Targeted systems biology profiling of tomato fruit reveals coordination of the Yang cycle and a distinct regulation of ethylene biosynthesis during postclimacteric ripening. *Plant Physiol* 160(3):1498-1514.

Vera-Sirera F, Minguet EG, Singh SK, Ljung K, Tuominen H, Blázquez MA, Carbonell J (2010) Role of polyamines in plant vascular development. *Plant Physiol Biochem* 48(7):534-539.

Vierstra RD (2009) The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nature Reviews* 10(6):385-397.

Vogel JP, Woeste KE, Theologis A, Kieber JJ (1998) Recessive and dominant mutations in the ethylene biosynthetic gene ACS5 of Arabidopsis confer cytokinin insensitivity and ethylene overproduction, respectively. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(8):4766-4771.

Waduware-Jayabahu I, Oppermann Y, Wirtz M, Hull ZT, Schoor S, Plotnikov AN, Hell R, Sauter M, Moffatt BA (2011) Recycling of methylthioadenosine is essential for normal vascular development and reproduction in Arabidopsis. *Plant Physiol* 158(4):1728-1744.

Walden R, Cordeiro A, Tiburcio AF (1997) Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant Physiol* 113(4):1009-1013.

Wang SY, Adams DO, Lieberman M (1982) Recycling of 5'-methylthioadenosine-ribose carbon atoms into methionine in tomato tissue in relation to ethylene production. *Plant Physiol* 70(1):117-121.

Wang Y, Kumar PP (2007) Characterization of two ethylene receptors PhERS1 and PhETR2 from petunia: PhETR2 regulates timing of anther dehiscence. *J Exp Bot* 58(3):533-544.

Weigel D, Glazebrook J (2002) *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Wimalasekera R, Villar C, Begum T, Scherer GF (2011a) COPPER AMINE OXIDASE1 (CuAO1) of *Arabidopsis thaliana* contributes to abscisic acid- and polyamine-induced nitric oxide biosynthesis and abscisic acid signal transduction. *Mol Plant* 4(4):663-678.

Wimalasekera R, Tebartz F, Scherer GF (2011b) Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Sci* 181(5):593-603.

Wirtz M, Droux M, Hell R (2004) O-acetylserine (thiol) lyase: an enigmatic enzyme of plant cysteine biosynthesis revisited in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 55(404):1785-1798.

Wirtz M, Hell R (2007) Dominant-negative modification reveals the regulatory function of the multimeric cysteine synthase protein complex in transgenic tobacco. *Plant Cell* 19(2):625-639.

Woeste K, Ye C, Kieber JJ (1999) Two *Arabidopsis* mutants that overproduce ethylene are affected in the posttranscriptional regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase. *Plant Physiol* 119:521-529.

Wu H, Min J, Zeng H, McCloskey DE, Ikeguchi Y, Loppnau P, Michael AJ, Pegg AE, Plotnikov AN (2008) Crystal structure of human spermine synthase: implications of substrate binding and catalytic mechanism. *J Biol Chem* 283: 16135–16146.

Yamagami T, Tsuchisaka A, Yamada K, Haddon WF, Harden LA, Theologis A (2003) Biochemical diversity among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase isozymes encoded by the *Arabidopsis* gene family. *Journal Biol Chem* 278(49):49102-49112.

Yanagisawa S, Yoo SD, Sheen J (2003) Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. *Nature* 425(6957):521-525.

Yang SF, Hoffmann NE (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* 35:155-189.

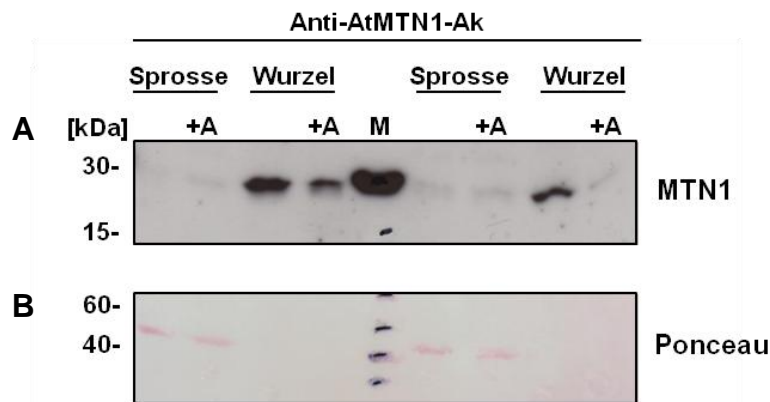
Yip WK, Moore T, Yang SF (1992) Differential accumulation of transcripts for four tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase homologs under various conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(6):2475-2479.

Yokotani N, Nakano R, Imanishi S, Nagata M, Inaba A, Kubo Y (2009) Ripening-associated ethylene biosynthesis in tomato fruit is autocatalytically and developmentally regulated. *J Exp Bot* 60(12):3433-3442.

Zhang Z, Chen H, Huang X, Xia R, Zhao Q, Lai J, Teng K, Li Y, Liang L, Du Q, Zhou X, Guo H, Xie Q (2011) BSCTV C2 attenuates the degradation of SAMDC1 to suppress DNA methylation-mediated gene silencing in Arabidopsis. *Plant Cell* 23(1):273-288.

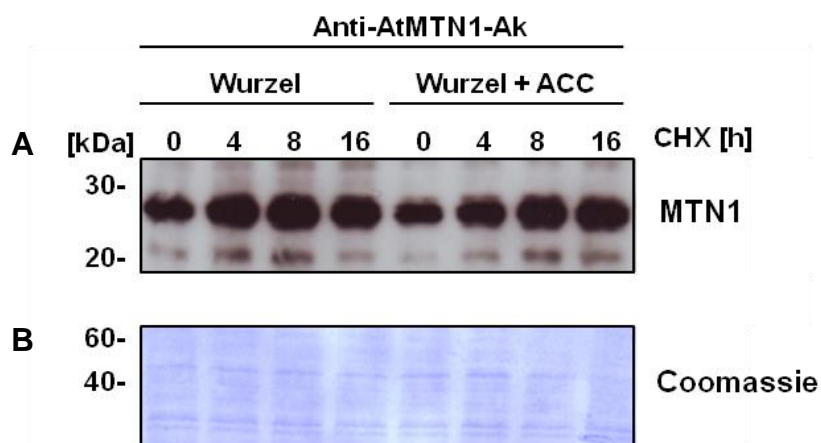
Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W (2004) GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* 136(1):2621-2632.

ANHANG



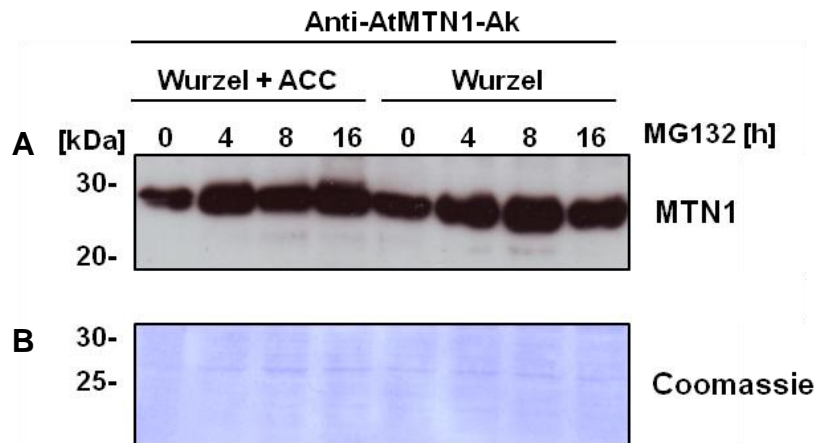
Anhang 1: Behandlung mit ACC führt zur Reduktion der MTN1 Proteinmenge in der Wurzel.

Nachweis von MTN1 in verschiedenen Proteinextrakten von 14 Tage alten Sprossen und Wurzeln von Arabidopsis über Westernblot. Die Pflanzen wurden für 14 Tage auf 0,5 x MS Medium oder 0,5 x MS Medium mit 10 μ M ACC (+A) angezogen. (A) Gezeigt ist ein Blot mit zwei unterschiedlichen Experimenten. (B) Als Beladungskontrolle wurde die verwendete Membran mit Ponceau gefärbt.



Anhang 2: MTN1 zeigt keine Degradation bei 16 Stunden CHX Behandlung.

Nachweis von MTN1 in verschiedenen Proteinextrakten von 14 Tage alten Arabidopsiswurzeln über Westernblot. Die Pflanzen wurden für 14 Tage auf 0,5 x MS Medium oder 0,5 x MS Medium mit 10 μ M ACC angezogen und für 0, 4, 8 oder 16 Stunden [h] mit 100 μ M Cycloheximid (CHX) behandelt. (A) Gezeigt ist der Western Blot nach Inkubation auf einem Röntgenfilm. (B) Als Beladungskontrolle wurde die verwendete Membran mit Coomassie gefärbt.



Anhang 3: Behandlung mit MG132 führt zur Akkumulation von MTN1 in der Wurzel.

Nachweis von MTN1 in verschiedenen Proteinextrakten von 14 Tage alten Arabidopsiswurzeln über Westernblot. Die Pflanzen wurden für 14 Tage auf 0,5 x MS Medium oder 0,5 x MS Medium mit 10 μ M ACC angezogen und für 0, 4, 8 oder 16 Stunden [h] mit 100 μ M MG132 behandelt. (A) Gezeigt ist der Western Blot nach Inkubation auf einem Röntgenfilm. (B) Als Beladungskontrolle wurde die verwendete Membran mit Coomassie gefärbt.

DANKSAGUNG

Zuerst einmal bedanke ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Margret Sauter ganz herzlich für die Unterstützung, das mir entgegengebrachte Vertrauen und die konstruktive Kritik während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit.

Des Weiteren danke ich allen Laborkollegen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Entwicklungsphysiologie der Pflanzen“ für die Unterstützung und angenehme Arbeitsatmosphäre. Dr. Markus Wirtz, danke ich für die gute Zusammenarbeit und die problemlose Kommunikation.

Schließlich danke ich meinen Freunden und insbesondere meiner Familie, die mir jederzeit mit einem offenen Ohr zur Seite standen und mir durch ihre Unterstützung das Studium ermöglicht haben.

LEBENS LAUF

Yasmin Oppermann

Persönliche Daten

Geburtstag	29.04.1984
Geburtsort	Flensburg
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schul Ausbildung

08/1995 – 06/2003	Integrierte Gesamtschule, Flensburg
13.06.2003	Abschluss Abitur

Hochschulausbildung

10/2003 - 02/2009	Biologiestudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel mit Botanik als Hauptfach und Zellbiologie sowie Toxikologie als Nebenfächer
12/2007 – 12/2008	Diplomarbeit mit dem Titel „Molekulare Analyse von putativen Lipocalinrezeptoren und eines putativen Lipocalins in <i>Arabidopsis thaliana</i> “ an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Abteilung für Entwicklungsbiologie und Physiologie der Pflanzen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Sauter
17.02.2009	Abschluss Diplom-Biologin
seit 04/2009	Promotionsstudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel mit Botanik als Hauptfach

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit „**Regulation des Methioninzyklus durch die Polyaminbiosynthese und den Ethylensignalweg in *Arabidopsis thaliana***“, abgesehen von der Beratung durch meine Betreuerin Frau Prof. Dr Margret Sauter, nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Die vorliegende Arbeit hat zu keinem Teil bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen und wurde weder ganz noch zum Teil veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht. Die vorliegende Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Kiel, den

Yasmin Oppermann